

Université de Montréal

Expansion des mégacaryocytes par HoxB4 pour accélérer la reconstitution
plaquettaire

Par
Jessica Trottier

Département de Sciences biomédicales
Université de Montréal
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine en vue de l'obtention du grade de
maîtrise en Sciences biomédicales (M.Sc.)

Décembre 2014

© Jessica Trottier, 2014

Université de Montréal
Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé :
Expansion des mégacaryocytes par HoxB4 pour accélérer la reconstitution
plaquettaire

Présenté par :
Jessica Trottier

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Directeur de recherche :
Denis Claude Roy

Président Rapporteur :
Julie Bergeron

Membre du Jury :
Renée Bazin

Résumé

La greffe de cellules souches hématopoïétiques est parfois le seul traitement efficace contre les cancers hématologiques ainsi que plusieurs autres désordres reliés au système hématopoïétique. La greffe autologue est souvent le traitement de choix pour les patients atteints de lymphome ou de myélome. Dans ce cas, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) du patient sont récoltées et congelées. Le patient subit ensuite des traitements de chimiothérapie et/ou radiothérapie qui éliminent les cellules malignes, mais détruisent aussi son système hématopoïétique. Ce dernier sera ensuite reconstitué par la greffe de CSH. Ces traitements ont pour conséquence de plonger le patient en état d'aplasie pour une période variant de 2 à 4 semaines. La thrombocytopénie (faible taux de plaquettes) est une complication majeure nécessitant des transfusions plaquettaires répétées et associée à une augmentation de la mortalité hémorragique post-transplantation. Il serait particulièrement intéressant de développer une thérapie accélérant la reconstitution des mégacaryocytes (MK), ce qui aurait pour effet de raccourcir la période de thrombopénie et donc de diminuer les besoins transfusionnels en plaquettes et potentiellement augmenter la survie. HOXB4 est un facteur de transcription qui a déjà démontré sa capacité à expandre les CSH et les progéniteurs multipotents (CFU-GEMM) donnant naissance aux MK. Il est donc un bon candidat pour l'expansion des progéniteurs MK. Comme la protéine HoxB4 a par contre une courte demi-vie (~1.1h), des protéines HoxB4 de deuxième génération avec une plus grande stabilité intracellulaire ont été créées (1423 (HoxB4^{L7A}), 1426 (HoxB4^{Y23A}) et 1427 (HoxB4^{Y28A})). Nous avons donc étudié la capacité d'HoxB4 sauvage et de deuxième génération à expandre les CSH, ainsi que les MK donnant naissance aux plaquettes. La surexpression rétrovirale de ces protéines HoxB4^{Y23A} et HoxB4^{Y28A} conduit à une expansion des progéniteurs MK murins in vitro supérieure à HoxB4-wt, 1423 et au contrôle GFP. La reconstitution plaquettaire in vivo dans un modèle murin a ensuite été évaluée par des transplantations primaires et secondaires. Les résultats révèlent que la

surexpression rétrovirale des différents HoxB4 n'apporte pas de bénéfice significatif à la reconstitution plaquettaire des souris. Lorsque cultivées dans un milieu favorisant la différenciation mégacaryocytaire, le traitement de cellules CD34+ dérivées du sang de cordon ombilical avec les protéines recombinantes TAT-HoxB4^{WT} ou de seconde génération n'a pas augmenté la production plaquettaire. Par contre, de manière intéressante, les cellules CD34+ provenant de sang mobilisé de patients atteints de myélome et mises en culture dans un milieu favorisant l'expansion des CSH ont montré des différences significatives dans la différenciation des progéniteurs MK en présence de la protéine recombinante TAT-HoxB4. La protéine HOXB4 possède donc un avenir prometteur quant à une amélioration de l'état thrombocytopénique chez les patients.

Mots clés : HoxB4, plaquettes, cellules souches hématopoïétiques (CSH), mégacaryocytes, expansion, CD34, sang de cordon, thrombocytopénie

Abstract

Haematopoietic stem cell (HSC) transplantation is the most efficient treatment against a number of cancers or other disorders of the hematologic system. Prior to HSC transplantation, patients are exposed to high doses of radiotherapy and/or chemotherapy to eliminate malignant cells. However, these treatments result in a state of aplasia, particularly in thrombocytopenia, which is characterised by very low blood platelet counts. Platelets produced by megakaryocytes (MK) are essential components of the blood system and play a critical role in the prevention of bleeding. Thus a low platelet blood level is a major complication and contributes significantly to transplant related mortality. At present, regular infusion of platelets isolated from healthy donors is the treatment of choice for thrombocytopenia. However, this is cumbersome for patients as well as donors and, in many instances results in platelet refractoriness due to the generation of auto-antibodies against disparate HLA molecules expressed on donor platelets. Therefore, the development of strategies to accelerate MK production and thus platelet reconstitution post HSC transplant would represent a major advance. It has already been shown that HoxB4 expands HSC and multipotent progenitors (CFU-GEMM) that give rise to megakaryocytes (MK). Thus HoxB4 is a great candidate for in vitro MK progenitor expansion. However, the short half-life of HoxB4 protein prompted us to generate a second generation of HoxB4 proteins with greater intracellular stability. We therefore studied the capacity of wild type (WT) and HoxB4 with 3 substitutions (1423 (HoxB4^{L7A}), 1426 (HoxB4^{Y23A}) and 1427 (HoxB4^{Y28A})) resulting in a longer protein half-life to expand HSC as well as MK progenitors. Retroviral-mediated expression of HoxB4^{Y23A} and HoxB4^{Y28A} proteins showed a greater expansion of murine MK progenitors, in comparison with HoxB4^{WT} or HoxB4^{L7A} proteins or GFP control. We also evaluated the ability of HSC expressing second generation HoxB4 to generate platelets in a murine model. Our results show that retroviral-mediated transduction of second generation HoxB4 in murine HSC does not provide a significant advantage over HoxB4^{WT} in platelet reconstitution in mice. Interestingly, treatment of CD34+ cells derived from cord blood showed only marginal effect of HoxB4^{WT} or second generation HoxB4 soluble recombinant proteins when

cultured under conditions optimized for megakaryocyte differentiation. Unexpectedly, CD34⁺ cells derived from mobilized peripheral blood of myeloma patients showed a significant increase in MK progenitor differentiation in the presence of TAT-HoxB4^{WT} when cultured in expansion medium for HSC. Thus, HoxB4 holds promise in autologous HSC transplantation for the treatment of thrombocytopenic patients.

Keywords: HoxB4, platelets, hematopoietic stem cell (HSC), megakaryocyte (MK), expansion, CD34, cord blood, thrombocytopenia

Table des matières

Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	x
Remerciements.....	xii
Introduction.....	1
L'hématopoïèse.....	3
Les cellules souches.....	4
Sources de cellules souches.....	6
Moelle osseuse.....	6
Sang périphérique.....	6
Sang de cordon.....	7
Greffe de cellules souches hématopoïétiques.....	9
La greffe allogénique.....	10
La greffe autologue.....	10
Les effets de la chimiothérapie et la thrombopénie.....	11
Mégacaryopoïèse et thrombopoïèse.....	13
Maturation des progéniteurs mégacaryocytaires (expression de CD34, CD41 et CD42)	14
Culture in vitro des MK.....	15
Les plaquettes.....	16
Mécanisme d'activation.....	17
Les plaquettes dans l'immunité.....	18
Facteur de transcription HoxB4.....	19
HoxB4 de 2 ^e génération.....	19
Protéine recombinante Tat-HoxB4.....	20
Hypothèse et objectifs du projet.....	21
Contribution des auteurs à l'article.....	22
Présentation de l'article.....	24
Introduction.....	25
Materials and Methods.....	27
Results.....	35
Discussion.....	42
Conclusion.....	44
Reference list.....	46
Figure legends.....	49
Discussion.....	66
Conclusions et perspectives.....	73
Références bibliographiques.....	77

Liste des tableaux

Tableau I : Sang de cordon ou cellules souches adultes : une grille comparative

Liste des figures

Mémoire :

Figure 1 : L'hématopoïèse

Figure 2 : Reconstitution suite à une aplasie

Figure 3 : Maturation des cellules de la lignée mégacaryocytaire

Article:

Figure 1: Impact of first and second generation HoxB4 on clonogenic murine MK progenitors

Figure 2: In vivo platelet reconstitution with HoxB4 transduced cells

Figure 3: Secondary bone marrow transplantation in limiting dilution conditions (LDA)

Figure 4: HSC frequency in the bone marrow

Figure 5: Effect of human recombinant TAT-HoxB4 on MK expansion from cord blood HSCs

Figure 6: In vitro expansion of human progenitors from CD34+ patient cells

Liste des abréviations

2-ME	Beta-mercaptoethanol
5-FU	5-fluorouracile
Ala	Alanine – Acide aminé
BS1	Meilleur cocktail de cytokine 1, « Cytokine cocktail Best Setting 1 »
BSA	Albumine sérique bovine, « Bovine serum albumin »
CB	Sang de cordon, « Cord blood »
CFU	Unité formatrice de colonie, « Colony forming unit »
CSH	Cellule souche hématopoïétique
CT	Court terme
CRU	Unité de repopulation compétitive, « Competitive repopulating unit »
ELDA	Essai en dilution limite extrême, « Extreme limiting dilution assay »
EPO	Érythropoïétine
FBS	Sérum bovin fœtal, « Fetal bovine serum »
G-CSF	Facteur de stimulation des colonies granulocytaires, “Granulocyte colony-stimulating factor”
GEMM	Granulocyte-Érythrocyte-Mégacaryocyte-Monocyte
GP	Glycoprotéine
GVHD	Maladie du greffon contre l’hôte, « Graft versus host disease »
HLA	Antigène leucocytaire humain « Human leukocyte antigen »
HSC	Haematopoietic stem cell
HXM	Hypoxanthin-Xanthin-Mycophenolic
IFN-γ	Interferon gamma

Ig	Immunoglobuline
IV	Intra-veineuse
LDA	Essai de dilution limite, «Limiting dilution assay»
LDL	Lipoprotéines de faible densité, « low density lipoproteins »
Leu	Leucine – Acide aminé
LT	Long terme
MK	Mégacaryocyte, « Megakaryocyte »
NCS	Sérum de veau fœtal, « Newborn-calf serum »
PLP	Particules en forme de plaquettes, « Platelet-like particles »
PRP	Plasma riche en plaquettes, « Platelet-rich plasma »
RT	Rétrovirus, « Retrovirus »
SCF	Facteur de cellules souches, « Stem cell factor »
TPO	Thrombopoïétine
Tyr	Tyrosine – Acide aminé

Remerciements

Premièrement, je désirerais remercier mon directeur de recherche, Dr Denis Claude Roy qui m'a d'abord accueilli dans son laboratoire lors de mon stage d'été pour l'obtention de mon baccalauréat en Biochimie et Biotechnologies. Il m'a transmis sa passion pour la recherche biomédicale, et m'a encouragée à poursuivre mes études à la maîtrise en Sciences biomédicales dans son laboratoire. Nous avons discuté ensemble d'un projet constructif pour la maîtrise, et il m'a proposé un projet connexe à celui poursuivi durant mon stage d'été. Cela me permettait de pousser plus loin mon apprentissage dans ce domaine, ainsi que de développer mon expertise en la matière.

Je dois aussi remercier le Dr Gorazd Krosi qui a su apporter réflexions et discussions afin d'amener le projet plus loin. De plus, je dois remercier le pilier de mon projet, Cynthia Thérien, qui a été mon superviseur pour la première année et qui a permis le bon départ et l'avancement du projet en me dirigeant sur la bonne voie, tout en me permettant de développer mon autonomie.

Je me dois aussi de remercier chaleureusement mes collègues de travail qui ont été d'une importance capitale tout au long de ma maîtrise, en apportant support moral, écoute, aide et conseils permettant le bon rendement de mon projet. J'aimerais remercier plus particulièrement Fannie Larochelle, Isabelle Savoie-Rondeau, Marie-Pier Giard et Radia Sidi-Boumédine.

Pour leur écoute, conseils et apport au projet, j'aimerais aussi remercier mon comité de parrainage composé du Dr Nicolas Pineault et du Dr Janetta Bijl. De plus, pour la lecture et l'évaluation de mon mémoire j'aimerais remercier les Drs Julie Bergeron et Renée Bazin.

Le Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont (CRHMR) est rempli de chercheurs et d'étudiants accueillants et dévoués toujours prêts à l'entraide. Je

tiens aussi à remercier le personnel de l'animalerie, de la plateforme de cytométrie, du centre de thérapie cellulaire, ainsi que du département d'obstétrique pour leur travail acharné.

Enfin, merci à mon copain qui croit toujours en moi dans tous les projets que j'entreprends, et qui a su me soutenir tout au long de mes études. Je dis aussi un grand merci à mes parents qui me soutiennent depuis le tout début.

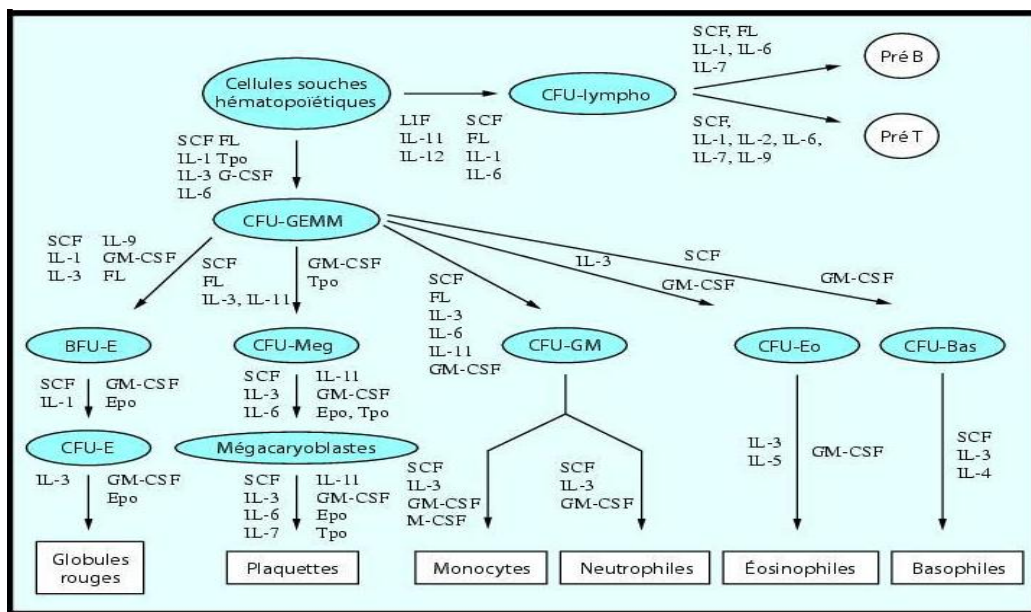
Merci à vous tous!

Introduction

L'hématopoïèse

L'hématopoïèse (Figure 1) est le processus physiologique complexe permettant la création et le renouvellement des cellules composant l'intégralité du système sanguin. Chaque jour dans l'organisme humain, il y a production de plusieurs milliards de cellules sanguines soit les érythrocytes, les leucocytes et les plaquettes. L'hématopoïèse est donc le processus normal qui permet l'équilibre entre l'auto-renouvellement des cellules souches et leur différenciation. Dans la régulation de celles-ci, les cellules souches hématopoïétiques sont destinées à différents sorts qui sont contrôlés par l'expression de gènes ou par des signaux externes provenant du microenvironnement de la moelle osseuse. Ces gènes régulent soit la prolifération, l'auto-renouvellement, l'adhésion, la migration, la différenciation, la mobilisation ou l'apoptose. [1]

Figure 1 : Schéma de l'hématopoïèse



Modifié de : **Annales de Biologie Clinique. Volume 61, Numéro 3, 259-67, Mai 2003, Revue générale, L. Douay**

CFU : *colony-forming unit* ; BFU : *burst-forming unit* (E pour érythroblastes, Meg pour mégacaryocytes, GM pour neutrophiles et macrophages, Eo pour éosinophiles, Bas pour basophiles) ; CSF : *colony stimulating factor* ; IL : interleukines ; SCF : *stem cell factor*, Epo : érythropoïétine ; Tpo : thrombopoïétine ; CFU-GEMM : progéniteurs à plusieurs potentialités (granulocytaire, érythrocytaire, mégacaryocytaire et macrophagique).

Les cellules souches

Les cellules souches sont des cellules indifférenciées capables de se différencier en cellules plus matures, ou de se maintenir par auto-renouvellement. Elles sont capables d'effectuer deux types de division cellulaire. La division symétrique qui donne naissance à deux cellules souches, et l'asymétrique qui donne naissance à un progéniteur et une cellule souche [2, 3]. La division asymétrique permet une maintenance des cellules souches, tandis que la division symétrique permet l'auto-renouvellement et l'expansion de celles-ci. Par contre, pour maintenir un potentiel d'auto-renouvellement, la cellule est dépendante d'un contact avec la niche de cellules souches [4].

Il existe plusieurs types de cellules souches chez l'humain. D'abord, les cellules souches embryonnaires, qui sont issues de cellules totipotentes, sont des cellules souches pluripotentes retrouvées au stage de blastocyte qui est un stage précoce de l'embryon [5, 6]. Elles sont capables de produire les 220 types de cellules du corps humain et sont responsables de constituer les trois couches de tissus primaires et donc un organisme pluricellulaire entier. Elles apportent donc une grande contribution à un grand éventail de tissus chez l'adulte. Ces CSH peuvent proliférer de manière illimitée et sans différenciation in vitro [7].

On retrouve aussi les cellules souches dites multipotentes, comme par exemple les cellules souches hématopoïétiques (CSH) qu'on retrouve dans la moelle osseuse adulte et dans le sang de cordon ombilical. Elles sont issues de cellules souches pluripotentes, et peuvent se différencier en un nombre limité de cellules spécifiques à un lignage cellulaire [8]. Lorsque les cellules sont suffisamment différenciées, qu'elles continuent de proliférer, mais ne donnent naissance qu'à un seul type cellulaire, on parle alors de cellules déterminées ou unipotentes [9].

Les CSH sont des cellules retrouvées dans la moelle osseuse adulte, qui sont majoritairement en dormance, et elles sont à l'origine des cellules sanguines et immunes que sont les érythrocytes, les leucocytes et les plaquettes [10]. En plus d'être des cellules multipotentes capables de reconstituer toutes les lignées hématopoïétiques, elles sont capables d'auto-renouvellement presque infini. Chez l'adulte, les cellules souches sont beaucoup plus rares et elles se situent dans des niches tissulaires en un nombre nécessaire au maintien de l'organisme [11]. On les retrouve à une fréquence d'environ 1 sur 10 000 dans la moelle osseuse et 1 sur 100 000 dans le sang.

Des études classiques décrivent deux populations de cellules souches hématopoïétiques : les CSH dites « court terme » (CT), et les CSH « long terme » (LT), qui donnent naissance aux CSH-CT. Selon ces études, les CSH-LT sont caractérisées comme étant rares, clonogéniques, multipotentes et ayant la capacité d'auto-renouvellement [12]. De plus, à elles seules, elles sont capables de reconstituer un système hématopoïétique animal à long terme. Les CSH-CT quant à elles, auraient plutôt un potentiel d'auto-renouvellement limité [13]. Celles-ci, aussi appelées cellules progénitrices ou précurseurs seraient plutôt responsables de se différencier en tous les types de cellules qui expriment des marqueurs spécifiques. Par contre, pour une reconstitution hématopoïétique efficace et rapide, les CSH-CT et LT sont toutes deux nécessaires. En plus d'être rares, les CSH-LT sont aussi moins efficaces pour reconstituer un receveur rapidement. Les CSH-CT seraient donc responsables du réapprovisionnement en progéniteurs, et donc de la reconstitution rapide et court terme [14].

Les CSH humaines sont caractérisées par une forte expression du marqueur de surface CD34, qui est le marqueur le plus crucial pour leur détection et identification. De plus, il est exprimé par les progéniteurs hématopoïétiques [15]. Il a été démontré que des cellules hématopoïétiques sélectionnées par l'anticorps CD34 étaient capables de reconstituer efficacement le système hématopoïétique de primates irradiés létalement [16]. Elles sont donc utilisées dans plusieurs études sur les

animaux, ainsi que dans des essais cliniques de transplantation et maintenant sur des patients [17]. Les CSH humaines sont déterminées comme étant CD34+, CD59+, CD90/Thy1+, CD38low/-, c-Kit-/low et Lin-. Le marqueur CD133 est aussi utilisé comme marqueur positif afin de définir les CSH-LT [18, 19].

Sources de cellules souches

Moelle osseuse

Puisque les CSH se retrouvent principalement dans la moelle osseuse, il est possible de prélever la moelle par plusieurs ponctions effectuées au niveau de l'os iliaque. Cette technique permet de récolter de nombreuses cellules. Par contre la fréquence de CSH est très basse et une cellule sur 10^6 représente une CSH transplantable [20]. De plus, cette technique est invasive et n'est presque plus utilisée [21].

Sang périphérique

La technique la plus répandue en clinique est le prélèvement de CSH mobilisées directement dans le sang. En effet, les cellules souches récoltées à partir du sang présentent plusieurs avantages. D'abord, ces cellules sont plus faciles à prélever chez le donneur. La procédure est moins invasive que le prélèvement de moelle osseuse, puisqu'elle implique seulement des accès veineux et ne nécessite pas d'anesthésie. Aussi la prise de greffe après infusion de cellules souches mobilisées est plus rapide que lors de l'infusion de cellules médullaires [22].

Le processus normal de développement des cellules hématopoïétiques est associé à une relâche continue de cellules en maturation dans la circulation sanguine, tout en maintenant une population de cellules souches indifférenciées dans la moelle osseuse [23]. Les CSH se détachent de la moelle osseuse pour circuler dans le sang,

se déplacer vers un lieu distant et ensuite retourner dans la moelle osseuse. Le G-CSF est un facteur de croissance qui, en plus d'induire la prolifération des neutrophiles, induit la relâche de protéases permettant de cliver la liaison des CSH aux cellules stromales de la moelle osseuse. Après plusieurs jours de stimulation, il y a une augmentation de CSH qui quittent la moelle osseuse pour être relâchées en périphérie, c'est ce qu'on appelle la mobilisation. Il est donc possible d'administrer du G-CSF au donneur de CSH pour augmenter le processus de migration de ces dernières et les retrouver en plus grande quantité dans la circulation sanguine [24]. Alors, par de simples prises de sang, il est possible d'obtenir de grandes quantités de CSH et ce, de manière beaucoup moins douloureuse que par la ponction osseuse. De plus, ces cellules seraient à un stade d'activation plus élevé que les CSH non-traitées, ou provenant de la moelle osseuse, ce qui expliquerait une meilleure prise de greffe et une reconstitution plus rapide [22, 25-27]. Cependant, dans le contexte des greffes autologues pour les patients atteints de cancers, le nombre de CSH recueillies est souvent insuffisant. Entre 5 et 46% des patients cancéreux sont de pauvres mobilisateurs, particulièrement à cause des traitements de chimiothérapie [28, 29]. Pour cette raison, il importe de développer des méthodes pour expandre les CSH. De plus, de telles approches pourraient permettre d'accélérer encore plus la reconstitution hématologique, ce qui serait relié à une diminution de la toxicité associée à la greffe.

Sang de cordon

Le sang de cordon est contenu dans le placenta et le cordon ombilical après la naissance d'un bébé. Ce sang est d'un très grand intérêt puisqu'il est constitué d'une concentration élevée de CSH, ce pourquoi il est de plus en plus utilisé pour effectuer des greffes de CSH chez des patients sans donneur HLA compatible [30, 31]. Cependant, il en contient une quantité totale beaucoup moins importante que la moelle osseuse ou le sang mobilisé, ce qui est le point faible majeur de cette source. Par contre, l'utilisation de sang de cordon ombilical comme source de cellules souches comporte plusieurs avantages. Contrairement au prélèvement de moelle

osseuse qui demande une procédure chirurgicale, la collecte de sang de cordon ombilical est facile et sans danger pour la mère et l'enfant [32, 33]. Dans le cas d'une réussite de transplantation de cellules souches provenant de la moelle osseuse ou du sang mobilisé, il doit y avoir une compatibilité optimale des antigènes leucocytaires humains (HLA) entre le donneur et le receveur. Cependant, lorsque des cellules souches de sang de cordon sont utilisées, les cellules du donneur sont plus enclines à démontrer une prise de greffe dans le système du receveur, même si il n'y a qu'une compatibilité HLA partielle. De plus, ces cellules engendrent moins de maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) malgré une compatibilité qui n'est que partielle. L'utilisation de sang de cordon augmente donc la probabilité d'identifier un donneur approprié pour une greffe comparativement à l'utilisation de donneurs conventionnels dont on utilise la moelle osseuse ou le sang mobilisé. Pour cette raison, l'utilisation du sang de cordon est beaucoup plus grande pour les patients pour lesquels on n'arrive pas à identifier un donneur compatible. La collecte de sang de cordon est aussi simplifiée du fait que ce produit cellulaire n'est pas utilisé et simplement détruit après l'accouchement [34]. De plus, le sang peut être disponible rapidement puisqu'il est habituellement stocké congelé dans des banques de cellules de sang de cordon situées dans différents centres à travers le monde. Le typage HLA et le nombre de cellules nucléées ainsi que le nombre de cellules CD34 positives sont habituellement rapidement disponibles, ce qui permet leur utilisation rapide, en cas de demande urgente.

Le fait que les cellules de sang de cordon soient plus immatures que celles de la moelle osseuse ou du sang mobilisé diminue le risque de développer une GVHD, condition clinique où les cellules du donneur attaquent les tissus du receveur [35]. Comme cette complication est fréquente et potentiellement fatale, il s'agit d'un avantage non négligeable. De plus, plusieurs études suggèrent que l'effet greffon contre leucémie (GVL) est augmenté avec les greffes de sang de cordon comparativement aux greffes effectuées avec des CSH obtenues du sang [35]. Finalement, le sang de cordon est moins susceptible de contenir des virus qui posent un risque pour la greffe au receveur [33]. Un désavantage à l'utilisation des cellules

souches de sang de cordon pour la greffe est le volume plus petit de sang obtenu et donc le nombre de cellules souches moindre pouvant être administré à un receveur. Il faut donc fréquemment utiliser deux greffons de sang de cordon pour effectuer une greffe chez un adulte [36]. De plus, le temps de reconstitution hématologique et immune est plus long que lors de l'infusion de CSH obtenues du sang mobilisé ou de la moelle osseuse [32], ce qui augmente le risque d'infections tôt après la transplantation. De plus, de façon évidente, le donneur ne peut être réutilisé, pour une infusion de lymphocytes par exemple, advenant une rechute leucémique ou un problème de reconstitution immune [37, 38].

Tableau I : Sang de cordon ou cellules souches adultes : une grille comparative

Caractéristiques	Sang de cordon ombilical	Cellules souches du sang/moelle osseuse sans déplétion de cellules T
Disponibilité du greffon	Approvisionnement moins limité	Approvisionnement limité
Comptabilité	4/6 ou mieux	10/10 ou 9/10 optimal
Risque de GVHD	Risque réduit	Risque élevé
Risque d'infection après la transplantation	Très élevé	Élevé
Durabilité du greffon	Jusqu'à 16 ans	Approximativement 30 ans
Infusion de lymphocytes du donneur	Aucune	Disponible

Modifié de: Karen K. Ballen, *New trends in umbilical cord blood transplantation*. Blood, 2005. 105(10):3786-92

Greffe de cellules souches hématopoïétiques

La greffe de cellules souches hématopoïétiques est souvent la meilleure alternative thérapeutique pour les patients atteints de cancers hématologiques, particulièrement

dans les cas de maladie agressive ou récidivante. Elle est aussi utilisée pour le traitement de plusieurs autres désordres du système hématopoïétique tel que l'anémie aplasique ou encore des maladies héréditaires [39, 40]. Il se pratique en clinique deux types de greffe de CSH, à savoir la greffe allogénique et la greffe autologue [41, 42].

La greffe allogénique

Les greffes allogéniques sont surtout utilisées chez les patients atteints de leucémie mais peuvent aussi être utilisées pour traiter des lymphomes ou des myélomes [43]. Ce type de greffe implique que le patient ait un donneur compatible qui peut lui fournir des CSH capables de reconstituer en entier son système hématopoïétique [44, 45]. Avant de recevoir sa greffe le patient doit subir une chimiothérapie intensive avec ou sans radiothérapie afin d'éliminer toutes ses cellules hématopoïétiques qui seront remplacées par les cellules du donneur [46]. En plus de reformer un système hématopoïétique sain, les cellules immunitaires peuvent lutter contre les cellules malignes résiduelles et entraîner une rémission. Ce sont les cellules T du greffon d'un donneur en santé qui vont lutter contre les cellules malignes restantes, ce qu'on appelle l'effet greffon contre leucémie (GVL), et les infections, deux propriétés qui représentent des avantages importants de la greffe allogénique [42]. Par contre, les greffes allogéniques comportent le risque de GVHD qui se produit lorsque les lymphocytes T du greffon du donneur s'activent contre l'organisme receveur [47, 48].

La greffe autologue

Lorsqu'il n'y a pas de donneur compatible, comme c'est le cas chez environ 40-50% des patients atteints de leucémie [21], la greffe autologue peut parfois être utilisée et ainsi le risque de GVHD est éliminé. Les greffes autologues sont surtout efficaces dans le traitement des lymphomes [49] et des myélomes multiples [50-52]. Le patient doit alors subir un traitement de chimiothérapie et son système hématopoïétique sera

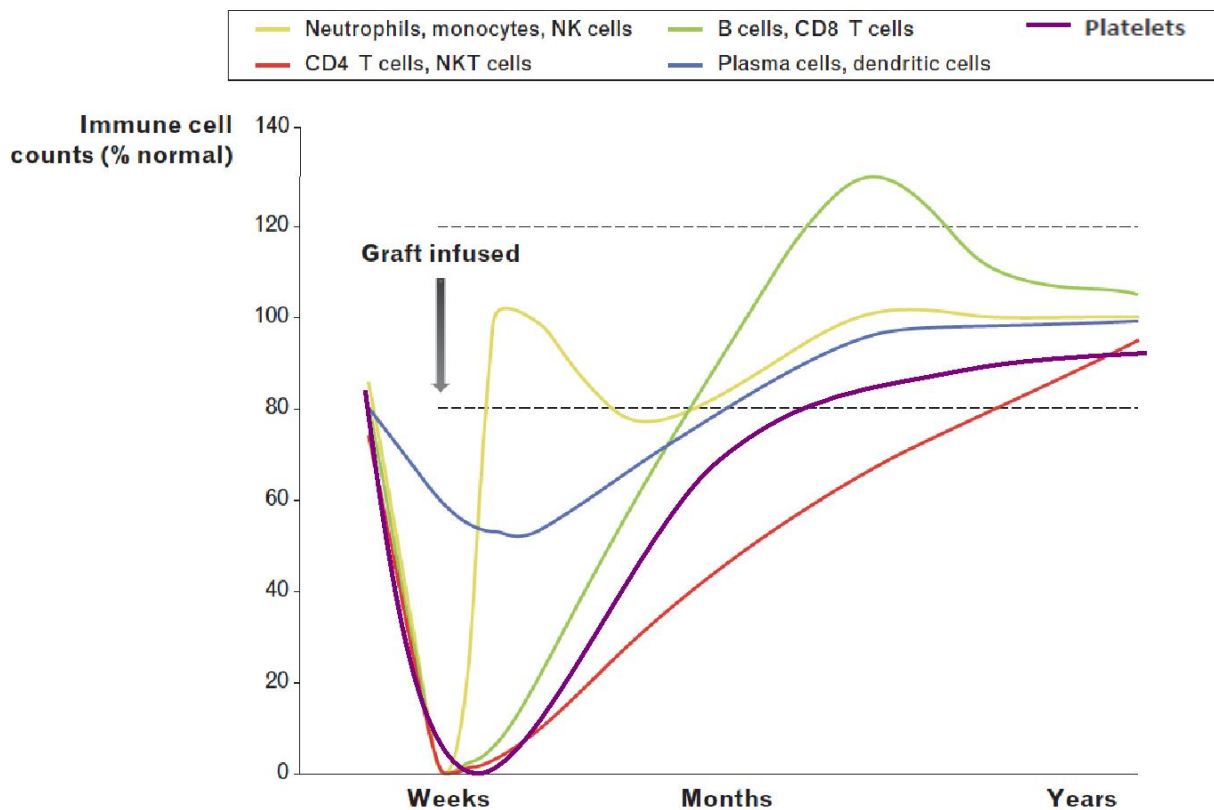
ensuite reconstitué par la greffe [44]. Cette méthode comporte elle aussi des désavantages. Premièrement, on perd l'effet greffe versus cellules cancéreuses retrouvé dans la greffe allogénique. Deuxièmement, comme le patient est atteint du cancer, il y a un risque élevé de retrouver des cellules cancéreuses dans le greffon, ce qui peut augmenter le risque de rechute. Enfin le nombre de cellules souches saines peut parfois être insuffisant et être associé à une difficulté à prélever un nombre suffisant de CSH pour réaliser la greffe, ou encore à un retard dans la prise de greffe, ce qui augmente le risque d'infection et implique une plus grande utilisation de produits sanguins à des fins de transfusion.

Les effets de la chimiothérapie et la thrombopénie

Après les traitements de radiothérapie et de chimiothérapie intensive administrés aux patients avant la transplantation de CSH, les patients se retrouvent en état d'aplasie [53]. C'est-à-dire qu'il y a arrêt, suite au traitement, de la production par la moelle osseuse des trois lignées de cellules sanguines, soit les globules rouges, les leucocytes et les plaquettes [54, 55]. L'hématopoïèse reprend graduellement tout d'abord par l'apparition des granulocytes, puis par les érythrocytes. Les plaquettes sont les dernières à être reconstituées, ce qui cause fréquemment des thrombopénies sévères (Figure 2) [56-58]. Cet effet secondaire qui est caractérisé par un taux très bas de plaquettes dans la circulation sanguine, est associé à des hémorragies sévères et donc à l'augmentation de la mortalité post-transplantation [59]. Comme il n'existe actuellement aucun traitement efficace avec des facteurs de croissance plaquettaire, les patients doivent recevoir des transfusions de plaquettes à répétition, [58, 60] ce qui peut entraîner des risques d'infection accrus, ou le développement de réactions immunes comme la réaction hémolytique aigue, particulièrement dans le cas de transfusions de plaquettes ABO incompatibles [61, 62]. Il a aussi été démontré que les patients recevant une transfusion plaquettaire ABO incompatible subissaient une moins forte augmentation du nombre de plaquettes dans le sang suite à la transfusion, en comparaison avec les patients

recevant des plaquettes compatibles [63]. Dans certains cas, il y a développement d'un état réfractaire, et le taux de plaquettes normal n'est jamais retrouvé, ou seulement suite à une très longue période de temps après la greffe [64]. Il est donc préférable d'identifier un donneur ABO compatible lors de l'administration de transfusions fréquentes au long terme, ce qui représente une difficulté significative. De plus, ces transfusions répétées constituent un processus coûteux et assez contraignant pour le patient [62]. Pour toutes ces raisons, il y a un très grand besoin de développer une thérapie induisant l'accélération de la reconstitution mégacaryocytaire (MK) et donc plaquettaire.

Figure 2 : Reconstitution suite à une aplasie



Modifié de : Bosch M. et al, *Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation*, Curr Opin Hematol., 2012.19(4):324-35

Mégacaryopoïèse et thrombopoïèse

Au niveau de la moelle osseuse, les CSH se différencient en cellules progénitrices myéloïdes ou lymphoïdes. Les cellules progénitrices myéloïdes donnent lieu aux unités de formation de colonie Granulocyte-Érythrocyte-Mégacaryocyte-Monocyte (CFU-GEMM). Celles-ci peuvent par la suite, après une série de divisions, se différencier en précurseurs de chaque lignée, dont les cellules progénitrices mégacaryocytaires (CFU-MK) qui deviennent ensuite des mégacaryoblastes [65]. Le MK, qui est le précurseur des plaquettes, est obtenu à la suite de plusieurs cycles mitotiques des mégacaryoblastes mais ce, sans cytokinèse ce qui lui permet de posséder un noyau polyploïde. C'est sous l'influence de la thrombopoïétine (TPO) [66] qu'il y a arrêt de la différenciation pour débiter la maturation durant laquelle les MK migrent de la niche ostéoblastique vers la niche vasculaire et c'est au cours de celle-ci qu'il y a endoréplication de l'ADN à chaque cycle. Durant la maturation, les MK entreprennent plusieurs rondes de duplication des chromosomes sans division cellulaire, jusqu'à 64 fois, c'est ce que l'on appelle le processus d'endomitose. Le MK entre en phase G1 et poursuit en phase S et G2, mais ne réussit pas à compléter la phase M. Ce faisant, il retourne en phase G1, ce qui a pour résultat de produire un seul noyau polylobé [67, 68]. Comme aucune division n'est menée à terme, le noyau double sa quantité d'ADN à chacune des divisions pour passer de MK basophile à granuleux et thrombocyto-gène, et atteindre une valeur modale de 16N. Cela permet d'accumuler beaucoup de cytoplasme, puisque le volume cytoplasmique augmente proportionnellement à la ploïdie. Ceci permet de procéder à la synthèse des nombreuses protéines et abondants lipides nécessaires à la fonction et au support de la production de plaquettes [69]. La grosseur du MK augmente aussi de manière substantielle (jusqu'à 100 µm), lui permettant d'acquérir les organelles, granules et protéines du cytosquelette spécifiques aux plaquettes. Ensuite, le MK se ramifie et émet des prolongements cytoplasmiques (proplaquettes) se dirigeant vers l'extérieur de la moelle. Enfin, ces prolongements mûrent dans le réseau vasculaire, se fragmentent, et il y a alors relâchement des plaquettes [70, 71]. Chaque MK peut

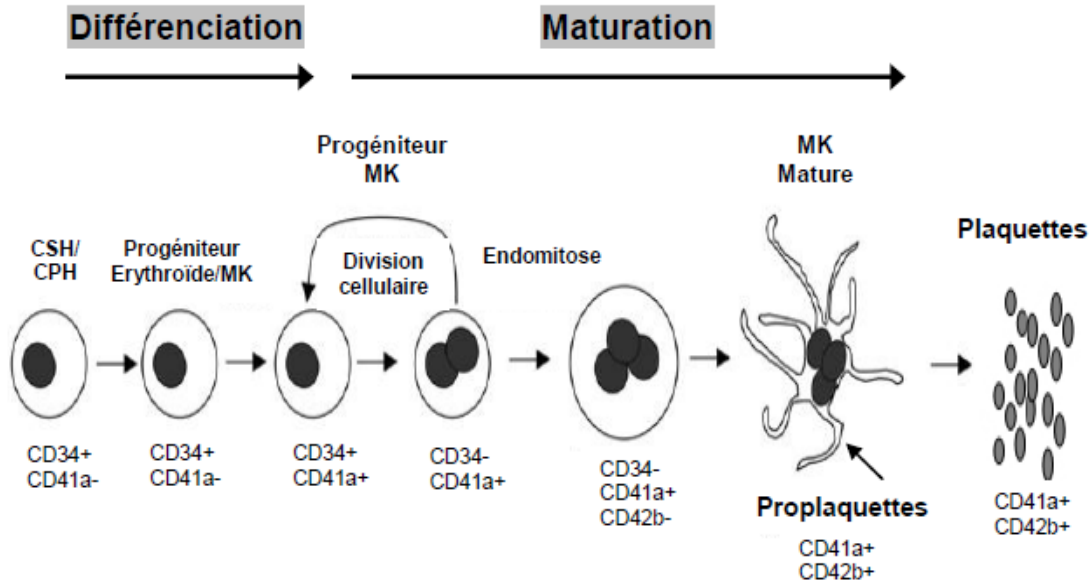
produire environ 2000 à 5000 plaquettes [72]. Ensuite, le matériel nucléaire résiduel est éliminé par phagocytose par les macrophages [73, 74].

Maturation des progéniteurs mégacaryocytaires (expression de CD34, CD41 et CD42)

Dès le stade de cellules souches, les cellules expriment le marqueur de surface CD34, qui est aussi un marqueur des cellules progénitrices hématopoïétiques immatures [75]. Ainsi, au cours du processus de différenciation vers la lignée plaquettaire, les progéniteurs mégacaryocytaires perdent l'expression de CD34 en devenant plus matures. Inversement, à ce stade, les cellules acquièrent l'expression des marqueurs CD41 (GPIIb) ou CD61 (GPIIIa/β3) [76], qui sont tous deux des marqueurs spécifiques de la lignée mégacaryocytaire et des plaquettes. Ces marqueurs sont donc exprimés du début de la maturation des MK jusqu'à la formation des plaquettes. Par contre, le marqueur CD42, qui est un marqueur de stade avancé de la différenciation peut être utilisé pour la discrimination des cellules de la lignée MK matures et immatures puisque son expression se retrouve seulement sur les MK matures et sur les plaquettes qui expriment à la fois CD41 et CD42 (Figure 3) [77].

L'étude de la maturation des plaquettes sanguines est importante puisque la thrombocytopénie est un problème important lors des greffes autologues. Un facteur de transcription favorisant l'expansion des cellules souches pourrait diminuer la durée de la phase d'aplasie consécutive à la greffe.

Figure 3 : Maturation des cellules de la lignée mégacaryocytaire



Modifié de : A Wickrema and J D Crispino, *Erythroid and megakaryocytic transformation*, Oncogene, 2007. 26(47): 6803-15

Culture in vitro des MK

L'étude de la mégacaryopoïèse, c'est-à-dire le processus par lequel les cellules souches génèrent des MK, est maintenant possible par la production et la culture de MK et plaquettes humaines in vitro [78, 79]. L'un des composants clés permettant cette production est la TPO [80-83]. In vitro, il a été démontré que la TPO augmente le nombre de progéniteurs mégacaryocytaires en culture et supporte leur maturation en procurant une maturation cytoplasmique et une polyploïdie cellulaire plus efficace [84, 85]. Lorsque l'on cultive des CSH avec seulement de la TPO, la production de MK est très pure, mais leur expansion est faible [86] et caractérisée par une apoptose précoce [87]. Par contre, plusieurs autres cytokines joueraient un rôle important dans la prolifération et la différenciation des MK, majoritairement en synergie avec la TPO, c'est le cas de l'IL-1 α et β , l'IL-6, l'IL-9, l'IL-11, interféron- γ (IFN- γ), le ligand Flt-3

(FLT3), le Stem Cell Factor (SCF) et l'érythropoïétine (EPO) [88-93]. Cependant, l'ajout de cytokines à la TPO comme l'IL-6, SCF et FLT3 augmente l'expansion des MK, mais réduit la pureté, en stimulant la maturation de cellules de lignées non-mégacaryocytaires [94]. Pour avoir une culture optimale, il doit y avoir un compromis entre la pureté de la population MK obtenue et la capacité d'expansion et de maturation. Le groupe du Dr Nicolas Pineault a optimisé un milieu de culture contenant une combinaison de facteurs permettant une pureté, une expansion et maturation importante des MK à partir de cellules souches de sang de cordon. Il s'agit d'un milieu optimisé sans sérum composé des cytokines humaines (IL-6, IL-9, SCF et TPO), combiné à des lipoprotéines faible-densité (LDL) et du substitut de sérum contenant une combinaison d'albumine/transferrine/insuline (BIT). Il a été démontré que la culture in vitro de CSH de sang de cordon ombilical dans ce milieu de culture résulte en une production accrue de MK et de plaquettes, tout en préservant un pourcentage de pureté élevé parmi la population cellulaire [95].

Les plaquettes

Les plaquettes sanguines possèdent une durée de vie de 8 à 10 jours. Lorsqu'elles ont atteint leur stade de maturité maximal, elles sont éliminées du système par les macrophages de la moelle osseuse, de la rate et du foie [96, 97]. Les plaquettes sanguines sont impliquées de façon majeure dans l'hémostase primaire [98, 99]. Lors d'un saignement ou lésion vasculaire, elles sont les premières à intervenir. Le processus de réponse se déroule en plusieurs étapes connues [100]. L'interaction plaquettes-vaisseaux comporte une phase d'adhésion et d'étalement, une phase d'activation et de sécrétion, une phase d'agrégation et une phase d'activité coagulante.

Mécanisme d'activation

Les plaquettes sont des cellules anucléées à forme discoïde, mais leur morphologie se transforme lorsqu'elles sont activées. Elles deviennent alors sphériques, leurs granules se centralisent et elles projettent des pseudopodes [101, 102]. Elles relâchent de nombreux agonistes tels que l'adénosine diphosphate (ADP), des molécules d'adhésion comme la P-sélectine, la thrombospondine, le fibrinogène et le facteur de Von Willebrand, ainsi que des facteurs de coagulation, des facteurs de croissance et des chémokines [103]. Malgré leur petite taille, le cytoplasme plaquettaire contient des organites comme un cytosquelette et quelques mitochondries qui procurent l'énergie, ainsi que des granulations (alpha et denses), des peroxysomes et du glycogène [104]. Le cytosquelette est composé majoritairement de filaments d'actine (reliés à la membrane externe), auxquels de nombreuses protéines se lient [105]. La membrane des plaquettes contient de nombreuses glycoprotéines, et sa composition dépend du stade d'activation. Des récepteurs de glycoprotéines spécifiques sont responsables de l'adhésion des plaquettes à la matrice extracellulaire. Les représentants majeurs de la membrane plaquettaire sont des composants des complexes de glycoprotéines (GP) Ib-IX-V (CD42b), GP IIb-IIIa (CD41-CD61) et GPVI [106]. Le complexe membranaire de glycoprotéines GP IIb-IIIa (CD41-CD61) qui est un récepteur pour le fibrinogène, ainsi que pour le facteur de Von Willebrand et la fibronectine, [107] se lie aux filaments d'actine, ce qui va entraîner l'agrégation plaquettaire. Les complexes GP Ib-IX-V et GPVI qui se lient respectivement au facteur de Von Willebrand et au collagène du sous-endothélium, [108] sont responsables de réguler l'adhésion et l'activation plaquettaire [109]. Ils constituent aussi un site d'interaction pour la thrombine [110]. Les plaquettes sont aussi dotées d'un récepteur à haute affinité pour la thrombopoïétine. De plus, elles expriment des récepteurs pour le fragment Fc des IgG et IgE.

Les plaquettes dans l'immunité

Il a récemment été démontré que les plaquettes joueraient aussi un rôle dans l'immunité innée et adaptative. En effet, elles portent les allo antigènes HLA-1 et ABH à leur surface. Bien que dénaturé, elles expriment le complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 (CMH 1) qui leur permet de reconnaître des allo anticorps spécifiques [111]. Plus précisément, l'implication des granules- α qui sont les plus abondants, a été révélée dans l'inflammation, l'athérosclérose, la défense anti-microbienne de l'hôte, l'angiogénèse, la guérison de blessures et les cancers [112]. Les plaquettes contiennent aussi des peptides antibactériens dans leurs granules- α , les thrombocidines 1 et 2, c'est ce qui leur permet de protéger l'hôte contre les infections [113]. Les plaquettes peuvent aussi favoriser l'activation immune en réponse à des motifs moléculaires conservés exprimés par les pathogènes, par l'expression de récepteurs de type Toll (TLR) à la surface [114]. Il a aussi été rapporté que les plaquettes humaines pouvaient avoir un effet protecteur lors d'infections des érythrocytes par la malaria par l'induction de la destruction des érythrocytes infectés et des parasites [115]. Les plaquettes auraient aussi une fonction en réponse aux virus par une promotion de la réponse immunitaire anti-virale médiée par les lymphocytes T cytotoxiques durant une infection par le virus de l'hépatite B par exemple. Les plaquettes doivent être activées pour être en mesure d'induire une accumulation des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques au virus au lieu de l'inflammation [116]. Il a aussi été vu dans les cas d'athérosclérose que les plaquettes participaient à favoriser la réponse inflammatoire, [117] soit par l'expression de facteurs facilitant l'adhésion des plaquettes aux autres cellules vasculaires, soit en relâchant diverses chémokines [118]. Il a aussi été démontré qu'elles peuvent promouvoir le recrutement de cellules immunitaires comme les cellules dendritiques [119].

Facteur de transcription HoxB4

Le facteur de transcription HoxB4, qui est un membre du complexe B des gènes homéotiques, occupe un rôle important dans le développement embryonnaire, ainsi que dans la régulation des CSH adultes [120]. Il a été démontré que les cellules hématopoïétiques murines surexprimant la protéine HoxB4 ont une capacité de reconstitution du compartiment des CSH supérieure, sans toutefois affecter la différenciation cellulaire [121]. Aussi, il a été démontré qu'HoxB4 est capable de favoriser l'autorenouvellement et l'expansion des CSH in vitro et in vivo, sans induire de prolifération incontrôlée, ni de transformation maligne [122-125]. La régulation positive par la protéine HoxB4 requiert une liaison avec des co-facteurs, plus particulièrement des membres de la famille des facteurs de transcription PBX et MEIS [126]. Cette association permet d'augmenter la spécificité d'HoxB4 pour des séquences de cibles spécifiques dans la région de l'amplificateur et du promoteur de gènes cibles [120].

HoxB4 de 2^e génération

Comme HoxB4 possède une courte demi-vie, seulement 4 heures, dans le milieu extracellulaire et d'environ 1.1 heure seulement en intracellulaire [127], il devient difficile de l'utiliser au point de vue thérapeutique. De plus, son utilisation sous la forme d'une protéine recombinante implique alors un ajout aux trois à quatre heures d'une dose de cette protéine, ce qui augmente le risque d'erreur ou de contamination par manipulations répétitives [127].

Il a été démontré que la dégradation de la protéine HoxB4 s'effectuait par la voie du complexe ubiquitine-protéasome [128]. De plus, les 31 premiers acides aminés de la protéine sont impliqués dans l'ubiquitination et donc dans la dégradation de la protéine. Cette séquence en N-terminal fut à la base de la création de nouvelles protéines HoxB4 mutées pouvant posséder potentiellement une demi-vie plus longue.

La délétion complète de ces 31 premiers acides aminés a d'abord été testée et il a été démontré que l'activité biologique de la protéine en était affectée (*Beslu et al*, en préparation). Suite à l'analyse moléculaire de la structure de la protéine HoxB4, des substitutions individuelles d'acides aminés dans cette même région ont été générées pour diminuer la dégradation : Leu7→Ala (1423), Tyr23→Ala (1426) et Tyr28→Ala (1427). Parmi ces substitutions, trois protéines mutées sont retenues (HoxB4^{L7A}, HoxB4^{Y23A}, HoxB4^{Y28A}) qui possèdent alors une seule mutation ponctuelle dans cette région, permettant une stabilité intracellulaire accrue de 3.5, 2.5 et 4.0 heures, respectivement. La demi-vie intracellulaire d'HoxB4-wt a été mesurée dans des travaux antérieurs par essai pulse-chase [126, 127] précédemment décrit [129]. De plus la demi-vie supérieure des protéines mutées a été montrée dans des travaux antérieurs par Western Blot avec une extraction de protéine sur des cellules de moelle osseuse de souris greffées 20 semaines auparavant avec des CSH surexprimant les différentes protéines HoxB4-wt et mutées (*Beauchemin et al*, en préparation).

Protéine recombinante TAT-HoxB4

L'infection par rétrovirus des CSH ne pouvant être utilisée de façon totalement sécuritaire en clinique, une protéine recombinante a été produite. La protéine HoxB4 a été couplée à TAT, qui est un domaine de transduction protéique transactivateur dérivé du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Ce transactivateur est responsable de la localisation nucléaire et de la transduction de la protéine. Il a été démontré comme étant utile pour le transport de protéine dans la cellule, ceci de façon rapide et sans apporter de toxicité considérable [130]. Cette structure a donc pour but de faciliter l'entrée de la protéine dans la cellule [131]. De plus, un marqueur constitué de 6 histidines a aussi ajouté au bout de la séquence protéique afin de faciliter la purification de celle-ci. Cette protéine recombinante est soluble, elle traverse la membrane cellulaire, elle peut donc être livrée de façon externe dans le milieu et n'implique pas de thérapie génique, ce qui permet une thérapie clinique plus

sécuritaire et accessible [132]. De plus, il a été démontré que cette protéine recombinante possède la capacité d'expandre les CSH humaines in vitro et ex vivo [127, 133, 134].

Hypothèse et objectifs du projet

Il est déjà bien établi que la protéine HoxB4 peut expandre les CSH in vitro et in vivo, autant chez les cellules humaines que murines [121, 122, 125]. Comme les CSH sont des cellules multipotentes, ces progéniteurs sont capables de former in vitro des colonies de cellules différenciées en progéniteurs GEMM pouvant donner naissance à toutes les lignées plus spécifiques. Dans notre laboratoire, nous avons démontré qu'HoxB4 favorise l'expansion des GEMM. Nous avons donc posé l'hypothèse qu'il pourrait aussi favoriser une plus grande production de progéniteurs mégacaryocytaires et ainsi accélérer la reconstitution plaquettaire suite à une greffe de CSH [135]. De plus, les protéines HoxB4-wt et mutées ont été évaluées pour l'expansion de CSH, mais elles n'ont pas été évaluées pour l'expansion de progéniteurs mégacaryocytaires. Nous voulons donc vérifier si les mutations ponctuelles du gène HOXB4 modifient l'effet de ce facteur sur l'expansion des progéniteurs MK in vitro et sur la reconstitution plaquettaire in vivo. Pour vérifier cette hypothèse, nous allons suivre in vitro et in vivo la reconstitution mégacaryocytaire et plaquettaire de souris C57BL/6 transplantées avec des CSH surexprimant les différentes protéines HoxB4-wt ou mutées. Finalement, la protéine recombinante TAT-HOXB4 est aussi connue pour sa capacité d'expansion des CSH in vitro sur des cellules humaines [127, 133]. Un des objectifs complémentaires consistera à évaluer sa capacité in vitro d'expansion des progéniteurs MK humains, ainsi que vérifier si les versions recombinantes mutées de la protéine ont le même effet. Pour ce faire nous allons analyser la capacité de différenciation et de maturation in vitro en MK et en plaquettes à partir de cellules CD34+ provenant de sang de cordon ombilical et de sang mobilisé de patients.

Contribution des auteurs à l'article

L'article a été entièrement rédigé par Jessica Trottier, sous la supervision du directeur de recherche Denis Claude Roy. Les résultats présentés ont été générés en totalité par Jessica Trottier. De plus, Cynthia Thérien a participé à la majorité des expériences.

Présentation de l'article

Accelerating platelets recovery by expansion of megakaryocyte progenitors with
HoxB4

Introduction

Thrombocytopenia is a blood disorder characterized by a decrease in platelet numbers in the blood of affected patients. The disorder arises due to reduced platelet production, an increase in platelet destruction/consumption, or splenic sequestration [1]. Cancer patients receiving high doses of chemotherapy with or without radiation therapy (to eliminate malignant cells) prior to hematopoietic stem cell (HSC) transplant usually show general aplasia [2] resulting in severely reduced platelet production. However, at the present time, effective long term therapy to treat thrombocytopenia is still not available [3, 4]. The current treatment regime involves transfusion of platelets isolated from healthy donors into thrombocytopenic patients to raise platelet levels. However, owing to the short lifespan of platelets [5], several platelet infusions are necessary to maintain adequate platelet levels, and must usually be administered for periods ranging from 2 to 4 weeks, the time required for the transplanted HSC to reconstitute and differentiate into platelet-producing megakaryocytes (MK) [3]. In some patients, platelet levels either fail to respond to transfusions or require platelet transfusions for even longer periods of time post-HSC transplantation [6]. Even when treated, patients with severe thrombocytopenia can suffer from spontaneous bleeding and haemorrhages, which at times result in mortality [7]. Therefore, it is crucial to develop therapeutic strategies that promote accelerated platelet reconstitution in thrombocytopenic patients. One strategy to shorten the period of thrombocytopenia is to inject increased numbers of HSCs, resulting in an augmented production of various blood cells including megakaryocytic (MK) progenitors. However, obtaining greater numbers of HSCs from patients or compatible donors is quite demanding and not a feasible solution for the treatment of thrombocytopenia.

In an attempt to find a factor that could expand cells of the MK lineage, we decided to focus on HoxB4, a transcription factor known as one of the most potent stimulators of HSC expansion [8-10]. Indeed, purified soluble recombinant TAT-HoxB4 has been shown to be highly effective in expanding HSCs ex vivo [11, 12]. However, the short

extra- and intra-cellular half-life of HoxB4 (3-4 hours and 40-60 minutes, respectively) has hampered clinical applications of the protein. The analysis of HoxB4 molecular structure led us to design second generation of HoxB4 expresser plasmids with the following substitutions: Leu7 →Ala, Tyr23 →Ala or Tyr28 →Ala that increased protein stability by interfering in the ubiquitin-proteasome-dependent degradation of the protein [13].

In the present article, we present data on the efficacy of a second generation of TAT-HoxB4 to expand HSCs and their differentiation into MK and platelet production in vitro. We also report the capacity of the second generation of HoxB4 proteins to promote expansion of HSCs and their differentiation and expansion into MK progenitors and platelet reconstitution in vivo using C57BL/6 murine model.

Materials and Methods

Animals

Mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) and housed in SPF facility at the HMR research center according to the Canadian Council on Animal Care (CCAC) and institutional animal care committee guidelines. Bone marrow cells isolated from 20 week old C57BL/6SJL (CD45.1+) mice were transplanted into 8-12 week old C57BL/6 (CD45.2+) mice (primary transplant recipients).

Generation of retroviral vectors expressing mutant HoxB4

WT or second generations HoxB4 were cloned into MSCV-IRES-GFP (MIG) retroviral vector. HoxB4^{WT} cDNA was cloned into MIG vector using standard molecular biology techniques. For mutating leucine7 (HoxB4^{L7A}), tyrosine23 (HoxB4^{Y23A}) or tyrosine28 (HoxB4^{Y28A}) to alanine, annealed double stranded oligonucleotides encoding the first 39 amino acid of HoxB4 and carrying the desired mutations were used to replace the wild type HoxB4 cDNA sequence in MIG retroviral vector. Each clone was sequenced to ensure fidelity of the cloned sequence.

Transfection and retrovirus production

Stable 293T GPG-VSV packaging cell line was transfected with retroviral plasmid DNA expressing GFP protein and WT or second generation HoxB4, along with plasmids encoding vesicular stomatitis virus G envelope protein (VSVG) and human

immunodeficiency virus-1 gag-pol in the presence of Lipofectamine 2000 (Invitrogen) [16]. 293T GPG-VSV cells transfected with HoxB4 or mutant MIG DNA were cultured in DMEM media supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Tetracycline (1µg/mL) was added to the culture to prevent gag expression and thereby production of functional virus. Twenty four hour post-transfection culture supernatant containing retroviral particles was collected every day up to one week, and filtered. The supernatant was then used to transduce a second packaging cell line, GP+E86, in the presence of polybrene (8µg/ml) to obtain helper free ecotropic retrovirus capable of infecting only CAT-1 expressing cells, which are mostly of murine origin. This infection process was repeated until the percentage of infected GP+E86 cells was close to 100% as assessed by GFP expression using flow cytometry. Transduced GP+E86 cell line were maintained in HMX medium consisting of DMEM supplemented with 10 % newborn calf serum (NCS), 250µg/mL xanthine, 15µg/mL hypoxanthine, and 25µg/mL mycophenolic acid for a maximum of 10 days.

Transduction and in vitro differentiation of mouse BM cells

Mouse BM cells isolated from C57BL/6SJL (CD45.1+) were stimulated for 2 days in DMEM supplemented with 15% FBS, 5 ng/ml IL-3, 10 ng/ml IL-6, 100 ng/ml SCF, 50 µg/ml gentamycin, 10 µg/ml ciprofloxacin and 50 mM 2-ME followed by transduction with wild type HoxB4-expressing retrovirus. Two days post transduction, GFP+ cells were sorted by flow cytometry. Part of the purified GFP+ cells was cultured further in medium that promotes differentiation and maturation of BM cells to the MK lineage (Figure 1A). This media was composed of DMEM supplemented with 15% FBS, 5 ng/mL IL-3, 100 ng/mL SCF, 50 ng/mL TPO, 50 mM 2-ME, 50 µg/mL gentamycin and 10 µg/mL ciprofloxacin. The remaining GFP+ cells were used for transplantation into 8-week old C57BL/6 mice (CD45.2+).

Primary and secondary bone marrow transplantation

Twenty week old C57BL/6SJL mice were injected with 5-fluorouracil (5-FU; 150 mg/kg body weight) and 4 days later bone marrow (BM) was isolated from tibias and femurs. BM cells were cultured in DMEM supplemented with 15% FBS (Hyclone laboratories, Logan, Utah, USA), 5ng/ml IL-3, 10ng/ml IL-6, 100ng/ml SCF, 50 µg/ml gentamycin, 10µg/ml ciprofloxacin, and 50nM 2-ME (BM stimulation medium). Forty-eight hours later, BM cells were infected with HoxB4 WT or mutant retrovirus by co-culturing them for 2 days over transduced or non-transduced irradiated (1500cGy) GP+E86 producer cells supplemented with 6µg/mL polybrene. GFP-expressing BM cells were then purified using flow cytometry (FACS Aria) and 1.5×10^5 GFP positive BM cells injected into the tail vein of lethally irradiated (850cGy) 8-12 week old C57BL/6 mice. Each group of four mice were injected with naive BM cells (cultured in the presence of untransduced packaging cell line), GFP, HoxB4^{WT}, HoxB4^{L7A}, HoxB4^{Y23A} or HoxB4^{Y28A} retrovirally transduced BM cells, and supplemented with 1.0×10^5 freshly isolated nontransduced support bone marrow cells.

Four months post-transplantation mice were sacrificed and BM cells harvested and pooled by group condition. The percentage of GFP positive cells in the bone marrow was assessed using flow cytometry for each group of mice. For secondary transplantation equal numbers of GFP positive BM cells were injected into the tail vein of lethally irradiated (850cGy) 8-12 week old C57BL/6 mice in a competitive repopulating unit (CRU) assay [8]. To this end, a limiting dilution assay was performed using five animal groups administered 50, 10, 2, 0.4 and 0.08 CRU (225,000 GFP+ cells is equivalent to 50 CRU) at four mice per group.

Blood samples

To evaluate platelet and haematopoietic reconstitution in transplant recipients, mice were bled every two or three weeks for primary and secondary transplantation respectively. Seventy-five μ l of blood was collected in an EDTA capillary by needle puncture of facial vein. Blood cells (platelets, lymphocytes and erythrocytes) were assessed by automated count (Beckman Coulter). To evaluate platelet reconstitution, platelet rich plasma (PRP) was then incubated with fluorescently labelled anti-CD41 antibody, washed, and analyzed by flow cytometry. GFP expression was used to discriminate platelets derived from transduced BM cells from endogenous or support BM cells.

To assess myeloid and lymphoid reconstitution, red blood cells were eliminated from the post-PRP fraction by incubating in ammonium chloride lysis buffer, and cells stained with fluorochrome coupled anti-mouse antibodies specific for myeloid (CD11b), T (CD3e), and B cells (CD45R or B220), and analyzed using flow cytometry to determine the percentage of each lineage derived from GFP labeled HSCs graft.

Limiting dilution assay analysis

Secondary transplant recipients were sacrificed at 12 weeks post transplantation and the frequency of GFP+ BM cells in individual mouse from each group was analyzed using flow cytometry. Animals with 1% and more GFP+ cells in total BM population (including lymphoid and myeloid cells) were considered as repopulated with transduced cells. Results were analyzed using ELDA (Extreme limiting dilution assay) software to determine HSC frequency in BM cells.

Cord blood (CB) and peripheral blood samples

Fresh umbilical CB units were obtained from healthy full-term deliveries at the Department of Obstetrics of Hospital Maisonneuve-Rosemont (HMR; Montreal, Quebec) after obtaining institutional ethics board review approval and signed informed consent. Peripheral blood collected from patients undergoing autologous stem cell transplantation was also used as a source of CD34⁺ cells. To this end, CD34⁺ cells were mobilized by administering granulocyte colony stimulating factor (G-CSF; 10 g/kg body weight) daily for 4 to 7 days prior to blood collection.

Isolation of CD34⁺ cells

Fresh CB samples were processed within 24 hours of collection. CB or peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated on a Ficoll Hypaque (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, United-States) density gradient following the manufacturer's instructions, and cryopreserved in aliquots of 50×10^6 cells. Thawed mononuclear cells from four to six CB units were mixed together prior to CD34⁺ cell enrichment to circumvent variability within individual CB units. CD34⁺ cells were enriched by negative selection using the EasySep human progenitor cell enrichment kit with platelet depletion (Stem Cell technologies, Vancouver, Canada).

TAT-HoxB4 protein production and treatment for expansion of CD34⁺ cells

Recombinant soluble TAT-HOXB4 protein was produced using a previously described protocol [11] (gift of Sauvageau G., University of Montreal (IRIC)), and stored at -80°C.

Human CD34⁺ cells were cultured in sterile bags in the presence of TAT-HoxB4-wt or mutated recombinant protein. At the beginning of the culture, 40nM of the protein was injected and this concentration was maintained by injecting 20nM protein every four hours into the bags using automated pumps [15].

In vitro differentiation of CD34⁺ cells into MK and platelets

CB- or PBMCs-derived CD34⁺ cells were used for in vitro differentiation into MK cells and platelet production as described below. CD34⁺ cells purified from the mobilized human PBMCs were cultured in stem cell expansion media consisting of X-Vivo15 medium (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, CA) supplemented with 100 ng/ml thrombopoietin (TPO), 100 ng/ml FMS like tyrosine kinase-3 (FLT3), 20 ng/ml interleukin-6 (IL-6), 100 ng/mL stem cell factor (SCF), 200 ug/ml transferrin, 10 ug/ml insulin and 50 mM 2-mercaptoethanol (2-ME) for 8 days in the presence or absence of purified recombinant wt-TAT-HoxB4 protein (40 nM).

For differentiation of CB-derived CD34⁺ cells into MK and platelets, cells were cultured (2×10^5 cells/ml) in Best Setting 1 (BS1) cytokine cocktail under serum free conditions [14] consisting of IMDM media supplemented with 20% BIT serum substitute, 20 µg/mL LDL (low density lipoproteins), 50 mM 2-ME, 30 ng/mL TPO, 1 ng/mL SCF, 7.5 ng/mL IL-6, 13.5 ng/mL IL-9, 50 µg/mL gentamycin and 10 µg/mL ciprofloxacin. Cells were fed with fresh BS1 media on days 4, 7 and 10. On day 12, metalloproteinase inhibitor GM6001 (25 µM) was added and cultured for two more days (total culture time of 14 days). Cells were incubated in 10% CO₂ at 39°C for the first 4 days, and then at 37°C until day 14. Differentiation and maturation of hematopoietic cells was followed by flow cytometry by gating on live cells (PI staining) and using anti-human antibodies for CD34, CD41 and CD42.

Platelet isolation by BSA (Bovine serum albumin) gradient

Platelets were isolated using 2 to 12% discontinuous BSA gradient. This BSA gradient was prepared by layering 1.5 mL of 12%, 10%, 7%, 5% and 2% BSA in a 13 ml conical tube. CB-derived CD34⁺ cells cultured for 14 days were pelleted, resuspended in CGS buffer (10X: 10mM sodium citrate, 30mM D-Glucose, 0.12 NaCl, pH 6.5) and gently layered on top of the BSA gradient. The gradient was centrifuged at low-speed (82g for 15 minutes) and the enriched platelet fraction was collected from the upper phase. Isolated platelets were analysed by flow cytometry with Forward and Side Scatter in logarithmic axes and anti-human CD41 and CD42 antibodies.

Flow Cytometry

Transduced mouse BM cells (GFP⁺) were sorted using a FACS Aria (BD Biosciences, Mississauga, ON Canada). Cell samples were stained with a combination of fluorescently labelled antibodies. Data were acquired on FACS Canto (BD Biosciences) and analyzed using Flow Jo software (Tree star Inc, Ashland, United-States). In vitro cultured CD34⁺ or BM cells were analysed by FACS at the time points indicated in figures. 10 000 to 100 000 events were acquired for analysis.

Clonogenic assay

MK progenitors and mature MK were evaluated following incubation in MegaCult-C medium (Stem Cell Technologies, Canada) supplemented with lipids and 20ng/ml IL-6, 10ng/ml IL-3, and 50ng/ml TPO in chambered slides for 10-12 days (6-8 days for mouse BM culture) at 37°C with 5% CO₂. Mouse BM cultures were fixed in acetone, whereas those from CD34⁺ human cells were fixed in a mixture of acetone and

methanol (3:1). Human CFU-MK were assessed by incubating cells with the MK lineage specific anti-CD41 primary antibody followed by biotinylated secondary antibody and detected using avidin conjugated alkaline phosphatase. Mouse CFU-MK were identified by their acetylcholinesterase expression, detected by the color staining due to the enzymatic reaction.

CFU-GEMM, CFU-GM, CFU-M, CFU-G and BFU-E were measured using MethoCult clonogenic assays (Stem Cell Technologies), according to manufacturer's instructions. At days 0, 5 and 7 of culture, 500 viable cells were plated in a petri dish containing methylcellulose semi-solid medium supplemented with 3U/mL erythropoietin, 50ng/mL SCF, 10ng/mL IL-6 and 10ng/mL IL-3. Cells were then incubated for 10 to 12 days at 37°C with 5% CO₂, and colonies were scored.

Results

Impact of WT and second generation HoxB4 on mouse BM cell differentiation into MK progenitors

To evaluate the potential role of HoxB4 in inducing the differentiation of mouse BM cells into MK progenitors and the ability of these progenitors to produce platelets, freshly isolated murine BM cells cultured two days in stimulation media were transduced with retrovirus expressing WT HoxB4 (HoxB4^{WT}) (Figure 1A). GFP expressing BM cells were purified using flow cytometry and cultured in vitro for 14 days in medium to induce differentiation into MK progenitors and mature MK. The frequency of CD41⁺ colonies was determined in the MK clonogenic assay for 0, 5 and 7 day old cultures. Figure 1B shows that transduction of BM cells with HoxB4^{WT} retrovirus followed by culture for 5 days results in a significant increase in the absolute number of both CFU-MK and CFU-Mix colonies compared with non-transduced cells as well as those transduced with control retrovirus expressing only GFP. This resulted in approximately 3-fold more CFU-MK or CFU-Mix colonies in HoxB4^{WT} retrovirus treated cultures in comparison to control retrovirus treated cultures. On culture day 7, HoxB4^{WT} transduced BM cultures showed a further increase in the absolute number of two types of colonies (Fig 1C). In contrast, increasing the incubation period resulted in decreasing numbers of both CFU-MK and CFU-Mix colonies in vector only controls. Thus, the number of CFU-MK and CFU-Mix in HoxB4^{WT} retrovirus treated day 7 cultures was increased by ~7- and ~20-fold over control retrovirus treated cultures. Collectively, these data support a role for HoxB4 in accelerating the differentiation of BM cells into MK.

To determine if increasing HoxB4 stability by mutating potential ubiquitination/degradation residues would promote the differentiation of BM cells into MK progenitors and mature MK, we generated three different second generation

HoxB4 expressing retroviruses; HoxB4^{L7A} (clone #1423), HoxB4^{Y23A} (clone #1426), and HoxB4^{Y28A} (clone #1427). Freshly isolated murine BM cells were transduced with retrovirus expressing either HoxB4^{L7A}, HoxB4^{Y23A}, or HoxB4^{Y28A} constructs, and the capacity of transduced BM cells cultured for 5 and 7 days to form CFU-MK and CFU-Mix (colony formed by MK and non-MK cells) was assessed in clonogenic assays (Fig. 1B and 1C). All three second generation HoxB4 BM cultures showed an increase in both CFU-MK and CFU-Mix over untransduced and empty vector controls on days 5 and 7. CFU-MK and CFU-Mix numbers were similar between HoxB4^{WT} and HoxB4^{L7A} treated BM cells cultured for 5 and 7 days. In contrast, HoxB^{Y23A} and HoxB4^{Y28A} transduced BM cultures showed less CFU-MK on day 5 than HoxB4^{WT} and HoxB4^{L7A}, but HoxB4^{Y23A} surpassed all others for CFU-MK production on day 7 of the culture. By contrast, the number of CFU-Mix derived from the day 5 culture was similar in all HoxB4 cultures. Interestingly, CFU-Mix were decreased for HoxB^{Y23A} and HoxB4^{Y28A} day 7 cultures when compared to HoxB4^{WT} BM cells.

In vivo platelet production upon BM exposure to WT and second generation HoxB4

To determine whether over expression of WT or second generation HoxB4 altered the ability of BM cells to produce platelets in vivo, we transduced BM cells isolated from C57BL6/SJL mice (CD45.1) with retrovirus expressing either HoxB4^{WT} or its variants, and injected the purified GFP+ BM cells into lethally irradiated C57BL/6 mice (CD45.2). Recipient mice were evaluated for platelet reconstitution every alternate week for 14 weeks. Figure 2A shows the kinetics of platelet chimerism in peripheral blood at the indicated times post injection. GFP+ platelets derived from transduced BM cells could be detected as early as 2 weeks post-transplantation. The average frequency of platelets derived from BM cells transduced with retrovirus was highest at 2 weeks in the GFP+ vector only group, with slightly lower platelet levels in animals transplanted with cells expressing WT and second generation HoxB4.

Platelet frequencies decreased gradually in GFP+ only cells, suggesting that culture conditions for platelet transduction induced transient but unsustained promotion of thrombopoiesis. In contrast, platelet levels remained stable or increased slightly until week 14 in mice administered with second generation HoxB4 transduced cells. Unexpectedly, the frequency of platelets derived from BM cells transduced with HoxB4^{WT} was very low (~5%) throughout this period, indicating that HoxB4^{WT} does not favor platelet differentiation in vivo. In contrast, from week 4 onwards, HoxB4^{Y23A} contributed most to platelet reconstitution with 50% or more platelets, a finding in agreement with day 7 in vitro clonogenic data (figure 1C).

Total platelet numbers were measured to determine non cell-autonomous impact of the different HoxB4 constructs (Figure 2B). Animals transplanted with unstimulated BM cells, stimulated BM and GFP+ only provided the highest total platelet levels (~560-700 x 10⁶/ml), while lower platelet levels were observed in those administered with HoxB4^{WT} and the 3 second generation HoxB4 transduced cells (~300-425 x 10⁶/ml).

HSC engraftment and in vivo platelet production after secondary transplantation with WT and second generation HoxB4 transduced murine BM cells

To study the ability of injected BM cells to engraft and differentiate into the MK lineage, BM cells were harvested from recipient mice at 16 weeks post-transplantation, pooled by group, and the frequency of GFP-expressing cells was determined by flow cytometry (Figure 3A). The proportion of BM GFP+ cells in the 3 second generation HoxB4 transplant groups at 16 weeks post transplantation was more than 4-fold that of mice transplanted with control cells (transduced with GFP only). Despite low blood platelet levels, mice transplanted with HoxB4^{WT} transduced.

BM cells showed a GFP+ cell frequency in BM that was similar to the second generation HoxB4 groups.

To determine the long term repopulating capacity of GFP+ BM cells, secondary transplantations were performed with BM from the above primary transplantation groups. Secondary transplant recipient mice belonging to each colony repopulation unit (CRU) group were injected with decreasing numbers of primary BM isolates of each treatment group, each one containing an equal number of GFP+ cells. This strategy allowed to determine secondary engraftment using limiting dilution analyses (225,000 GFP+ cells = 50 CRU) [8]. Blood platelets were analyzed by flow cytometry and enumerated using automated count at three week intervals for the 50 CRU group. Figure 3B shows that at 3 and 6 week post transplantation the proportion of platelets (CD41+) derived from the transplanted GFP+ BM cells was significantly higher for each of the HoxB4 mutant group compared to HoxB4^{WT} or GFP control groups. Interestingly, at 9 week post transplantation the frequency of blood platelets in HoxB4^{Y23A} and HoxB4^{Y28A} groups declined to levels observed in HoxB4^{WT} or GFP control group, whereas that in HoxB4^{L7A} group continued to increase and represented ~60% of total blood platelets. However, total blood platelet counts (derived from GFP transduced, non-transduced, and endogenous HSC) continued to increase throughout the course of the study (up to 12 weeks) in all except HoxB4^{L7A} groups. Thus, at 12 weeks post transplantation there were ~650-1000 x10⁶ platelets per mL of blood in all groups except HoxB4^{L7A} group, which contained ~125 x 10⁶ platelets per ml of blood (Fig 3C).

Effect of first and second generation HoxB4 on HSC frequency in vivo

To assess the impact of WT or mutant HoxB4 on HSC frequency in vivo, secondary recipients were sacrificed at 12 weeks post transplant, and the frequency of GFP+ cells was determined in BM cells isolated from individual mouse from each group.

The HSC frequency in the isolated BM cells was determined in limiting dilution assay and calculated using ELDA (Extreme limiting dilution assay) software. Mice with BM cells containing less than 1% GFP+ cells were considered negative. All HSC cells transduced with either WT or second generation HoxB4 exhibited greater HSC frequency than the GFP control group (Figure 4A). Amongst HoxB4 groups, HoxB4^{L7A} and HoxB4^{WT} transduced HSCs showed the highest and lowest frequency of HSCs, respectively, whereas those from HoxB4^{Y23A} and HoxB4^{Y28A} groups showed intermediate HSC frequency. HoxB4^{WT} increased HSC frequency in secondary transplants by ~3-fold, while HoxB4^{Y23A} and HoxB4^{Y28A} transduction increased HSC frequency by ~10-fold, and HoxB4^{L7A} was particularly efficient with ~70-fold HSC expansion over GFP only transduced control cells.

Effects of first and second generation TAT-HoxB4 on in vitro differentiation of cord blood (CB)-derived CD34+ HSC into progenitor and mature MK

Data presented above using murine BM indicated that second generation HoxB4, particularly HoxB4^{L7A}, increased HSC frequency in vivo (Fig. 4), and accelerated their differentiation into MK (Fig. 1 and 3). To determine if second generation HoxB4 had the same impact on human HSCs, we evaluated the effect of the different HoxB4 formulations on expansion and differentiation of CB-derived HSCs as these cells present particularly interesting clinical applications [17,18]. To circumvent potential risks associated with the introduction of retroviral sequences into human cells, we employed recombinant TAT-HoxB4 proteins purified from bacterial cultures for various experiments involving CB-derived HSCs. To this end, we isolated CD34+ cells from pooled units (4 to 6) of CB and cultured them in vitro for 14 days in cytokine optimized BS1 media. At days 0, 4, 7, 10 and 14 post-culture, differentiation of HSCs into MK and platelets was studied by flow cytometry. We also determined MK progenitors after ex vivo culture for 0, 4 and 7 days using a clonogenic assay. Total mononuclear cells were easily separated from platelets using flow cytometry (Figure

5A). During the first 7 days of culture, cell numbers were similar in all treatment conditions (Figure 5B). However, at day 10, cell numbers in individual cultures began to differ and this was magnified further in day 14 cultures. Untreated controls generated the highest and second generation HoxB4, the lowest increase in absolute cell numbers, whereas TAT-HoxB4^{WT} protein treated culture showed an intermediate increase in total cell counts.

In the initial culture (day 0) ~75% of cells were CD34+ with very few cells belonging to MK lineage (CD41+CD42- and CD41+CD42+; Figure 5C). Interestingly, all cultures exposed to BS1 culture conditions exhibited a dramatic increase in the mature MK population (CD41+CD42+)(Figure 5D). However, untreated, first and second generation HoxB4 all exerted the same effect on CD41+CD42+ cell production at days 4, 7, 10 and 14.

In contrast to flow cytometry data, clonogenic assays showed remarkably different results. Compared to untreated cultures, the number of CFU-MK colonies was slightly reduced in TAT-HoxB4^{WT} versus untreated 4 day cultures (Figure 5E). The number of CFU-MK colonies was lowest in cultures treated with second generation TAT-HoxB4 proteins. A similar trend was also observed for CFU-Mix colonies at day 4. This trend was maintained for day 7 cultures although the difference between first and second generation TAT-HoxB4 treated cultures was reduced (Figure 5F). CFU-MK colonies in day 7 cultures were ~3-fold more abundant in second generation TAT-HoxB4 cells, and ~2-fold more in untreated or TAT-HoxB4^{WT} treated cells compared to day 4 cultures.

Finally, to determine the ability of TAT-HoxB4 treated CB CD34+ cells to produce platelets in culture, we isolated platelet-like particles (PLP) from day 14 culture on a BSA gradient and analyzed CD41+CD42- and CD41+CD42+ expression by flow cytometry (Figure 5G). Similarly to CFU-MK clonogenic assays, we observed the lowest frequency of highly differentiated PLPs (CD41+CD42+) in cells exposed to second generation TAT-HoxB4 in comparison to WT or untreated cultures. (This

experiment having been done only once it will have to be repeated before drawing any conclusion.)

Effect of TAT-HoxB4^{WT} recombinant protein on in vitro expansion of MK progenitors from myeloma patients' CD34+ cells

The ultimate goal of the present study is to determine whether first or second generation HoxB4 proteins could be exploited to expand/differentiate HSC into MK for the treatment of thrombocytopenia in cancer patients receiving HSCT. Thus it is important to study the impact of HoxB4 on HSC and progenitor cells isolated from patients themselves, which can then be used for autologous HSCT. To this end, CD34+ cells from mobilized peripheral blood of myeloma patients were isolated and cultured in stem cell expansion media (as described) in the presence of recombinant TAT-HoxB4^{WT} protein as described above. Cells from day 8 cultures were assessed in a MK clonogenic assay and MK subsets were analyzed using flow cytometry. TAT-HoxB4^{WT} treatment expanded CFU-MK colonies from multiple myeloma patients in comparison to untreated controls (Figure 6A, C). In addition, TAT-HoxB4^{WT} did not prevent the increase in CFU-Mix colonies. Flow cytometry studies of cultured HSC demonstrated a corresponding increase in the number of immature MK progenitor cells (CD34+/CD41+ and CD34+/CD41+/CD42+) in TAT-HoxB4^{WT} compared to control treated HSC (Figure 6B,D). We also observed a slight increase in the number of mature MK cells (CD34-/CD41+/CD42-, CD34-/CD41+/CD42+) in TAT-HoxB4^{WT} treated cultures, however, due to low cell numbers and too short culture period it is difficult to conclude on the impact of HoxB4^{WT} on mature MK production.

Discussion

HoxB4 protein has been shown to promote HSC expansion and self renewal in vitro and in vivo [8, 9, 11, 12, 19] and these HSC differentiate into various blood lineages including MK lineage and ultimately platelets [20]. Enhancing MK progenitors would represent a significant advance in the treatment of several hematologic conditions that are associated with low platelet counts. HoxB4 has been shown to increase not only the number of HSC, but also of CFU-GEMM and CFU-MK, and could therefore play an important role in platelet recovery. However, the short half-life of HoxB4 could limit its efficacy. One approach to prolong HoxB4 half-life in order to enhance its ability to promote HSC expansion, differentiation into MK progenitors, and production of platelets is to increase protein stability by mutating amino acid residues that are critical for its degradation. To this end, we generated a series of second generation HoxB4 constructs with greater protein stability afforded by mutating leucine 7, tyrosine 23 or tyrosine 28 to alanine.

In this study, we investigated the ability of WT and second generation HoxB4 to promote MK differentiation and accelerate platelet reconstitution. We found that retroviral-mediated over expression of all HoxB4, WT or second generation, in murine BM cells resulted in a higher production of CFU-MK and -Mix colonies in vitro at days 5 and 7 compared to the GFP control. Surprisingly, transplanting retrovirally transduced cells into NSG mice yielded a lower number of total platelets in blood within all HoxB4 treated groups compared with GFP control or untreated groups. However, second generation HoxB4 treated BM cells contributed significantly more to total blood platelets (~40 to 60%) compared to those transduced with HoxB4^{WT} or GFP control (~10%). These data suggest that HoxB4^{WT} treatment not only impairs platelet production from the transduced cells (cell intrinsic effect) but the presence of these cells inhibits platelet production from the untransduced cells as well (cell extrinsic effect), and that the second generation of more stable HoxB4 proteins restores platelet production by MK, although not to the same extent as GFP controls

[21]. Further experiments are necessary to verify this inhibition of the production of platelets from untreated BM cells in the presence of HoxB4 treated BM cells.

Increased numbers of GFP expressing cells in the BM of HoxB4 treated compared control treated primary recipient mice indicate that HoxB4 enhances engraftment and haematopoietic reconstitution in these mice [9, 22]. Importantly, we found, using a limiting dilution assay that increasing the stability of HoxB4 augments HSC frequency by 3-fold (HoxB4^{Y23A} and HoxB4^{Y28A}) to 26-fold (HoxB4^{L7A}) over HoxB4^{WT} transduced group; the HoxB4^{WT} group itself showing a 3-fold increase in HSC over GFP control (Fig 4B), resulting in a greater than 60-fold HSC expansion over control. Platelet frequency and total counts in the peripheral blood of secondary transplant recipient mice at 12 weeks suggest that mutating leucine 7 is critical for enhanced frequency of CD41+GFP+ platelets. However, it has an adverse impact on endogenous platelet production. The two tyrosine mutants enhanced platelet production over HoxB4^{WT} and GFP control at the early time points (up to 6 weeks), but these tyrosine replacements failed to contribute to enhance platelet production from transduced BM cells. In contrast, contribution of HoxB4^{WT} treated BM cells to platelet production was minimal in the primary and secondary recipients and these cells did not inhibit endogenous platelet production in secondary recipients [21]. These data indicate that increasing the stability of HoxB4 by mutating leucine 7, tyrosine 23 or tyrosine 28, increases self renewal rate and expansion of short and long term stem cells in vivo compared to HoxB4^{WT}. However, these second generation HoxB4 constructs inhibit endogenous platelet production. This effect on HSC expansion and CFU-MK (in vitro) is most likely due to differences in the HoxB4 molecule and not to HSC transduction in itself. This is supported by findings using the recombinant proteins on UCB and myeloma patient-derived CD34+ cells.

Finally, we evaluated the effect of TAT-HoxB4^{WT} and second generation recombinant proteins as an adjunct in to enhance MK progenitor ex vivo expansion and differentiation from HSC (CD34+) purified from cord blood. The addition of

recombinant HoxB4 protein to the BS1 medium, which has been shown to promote megakaryocyte expansion, inhibited total cell expansion and did not have a positive effect on the generation of immature or mature MK (CD41+CD42+) cells or platelet production. One possible explanation for these results is that the BS1 cytokine cocktail media is already optimized to promote the differentiation and maturation of stem cells into the MK lineage and platelets [14]. The fact that all HoxB4 constructs resulted in lower platelet levels in vivo in comparison to untreated or GFP cells suggests that HoxB4 has a cell non-autonomous impact on surrounding megakaryocyte progenitors. The lower platelet levels found in second generation versus wild type HoxB4 correlates with HoxB4 half-life. This observation suggests that the extrinsic inhibitory activity of HoxB4 on megakaryocyte is due to HoxB4 tissue levels. This activity may not only be extrinsic, but also intrinsic, since the HoxB4^{L7A} construct produced the highest and sustained level of GFP+ platelets in vivo, but these animals had the lowest platelet levels overall. Nevertheless, the fact that HoxB4^{L7A} results in HSC expansion by more than 70-fold, would support its use for ex vivo HSC expansion prior to stem cell transplantation. Under such conditions, it is likely that it will have minimal or no effect on in vivo platelet production.

Conclusion

Increasing the stability of HoxB4 by modifying specific amino acids significantly increases the frequency of long term HSCs compared with HoxB4^{WT} and controls. Interestingly, HSCs transduced with second generation HoxB4 contributed to a greater extent to platelet production in vivo compared with those treated with HoxB4^{WT}. However, treatment of HSCs with either first or second generation HoxB4 demonstrated inhibition of platelet production thus resulting in diminished total platelet levels in vivo. While treatment of cord blood-derived HSCs with recombinant WT or second generation TAT-HoxB4 did not result in improved production of MK and platelets, treating CD34+ cells isolated from mobilized peripheral blood of myeloma

patients with HoxB4^{WT} accelerated differentiation of these cells into immature and mature MK in vitro. Such differences in the expansion and differentiation into MK lineage according to the nature of cells of origin warrants further dissection. Together, these results show that enhancing the intracellular stability of TAT-HoxB4 protein could be a promising strategy for the expansion of autologous HSCs. However, this may not respond to the need to accelerate platelet engraftment. The ability of HoxB4 to increase stem cell expansion and therefore number of administrated stem cells per graft may nevertheless compensate for such an effect.

Reference list

1. Veneri, D., et al., *Thrombocytopenias: a clinical point of view*. Blood Transfus, 2009. 7(2): p. 75-85.
2. Peffault de Latour, R., A. Cabrespine-Faugeras, and J.O. Bay, *[Ten years of changes in conditioning regimen for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adults]*. Bull Cancer, 2008. 95(1): p. 87-97.
3. Blajchman, M.A., et al., *New strategies for the optimal use of platelet transfusions*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2008: p. 198-204.
4. Kuter, D.J. and C.G. Begley, *Recombinant human thrombopoietin: basic biology and evaluation of clinical studies*. Blood, 2002. 100(10): p. 3457-69.
5. Nayak, M.K., P.P. Kulkarni, and D. Dash, *Regulatory role of proteasome in determination of platelet life span*. J Biol Chem, 2013. 288(10): p. 6826-34.
6. Blumberg, N., J.M. Heal, and G.L. Phillips, *Platelet transfusions: trigger, dose, benefits, and risks*. F1000 Med Rep, 2010. 2: p. 5.
7. Franchini, M., et al., *Bleeding complications in patients with hematologic malignancies*. Semin Thromb Hemost, 2013. 39(1): p. 94-100.
8. Antonchuk, J., G. Sauvageau, and R.K. Humphries, *HOXB4 overexpression mediates very rapid stem cell regeneration and competitive hematopoietic repopulation*. Exp Hematol, 2001. 29(9): p. 1125-34.
9. Antonchuk, J., G. Sauvageau, and R.K. Humphries, *HOXB4-induced of adult hematopoietic stem cells ex vivo*. Cell, 2002. 109(1): p. 39-45.

10. Klump, H., B. Schiedlmeier, and C. Baum, *Control of self-renewal and differentiation of hematopoietic stem cells: HOXB4 on the threshold*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1044**: p. 6-15.
11. Krosl, J., et al., *In vitro expansion of hematopoietic stem cells by recombinant TAT-HOXB4 protein*. Nat Med, 2003. **9**(11): p. 1428-32.
12. Huang, C.H., et al., *Purified recombinant TAT-homeobox B4 expands CD34(+) umbilical cord blood and peripheral blood progenitor cells ex vivo*. Tissue Eng Part C Methods, 2010. **16**(3): p. 487-96.
13. Lee, J., et al., *Improved ex vivo expansion of adult hematopoietic stem cells by overcoming CUL4-mediated degradation of HOXB4*. Blood, 2013. **121**(20): p. 4082-9.
14. Cortin, V., et al., *Efficient in vitro megakaryocyte maturation using cytokine cocktails optimized by statistical experimental design*. Exp Hematol, 2005. **33**(10): p. 1182-91.
15. Csaszar, E., et al., *An automated system for delivery of an unstable transcription factor to hematopoietic stem cell cultures*. Biotechnol Bioeng, 2009. **103**(2): p. 402-12.
16. Ory, D.S., B.A. Neugeboren, and R.C. Mulligan, *A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(21): p. 11400-6.
17. Magenau, J. and D.R. Couriel, *Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia: To Whom, When, and How*. Curr Oncol Rep, 2013.
18. Wagner, J.E. and E. Gluckman, *Umbilical cord blood transplantation: the first 20 years*. Semin Hematol, 2010. **47**(1): p. 3-12.

19. Amsellem, S., et al., *Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein*. Nat Med, 2003. **9**(11): p. 1423-7.
20. Chang, Y., et al., *From hematopoietic stem cells to platelets*. J Thromb Haemost, 2007. **5 Suppl 1**: p. 318-27.
21. Schiedlmeier, B., et al., *High-level ectopic HOXB4 expression confers a profound in vivo competitive growth advantage on human cord blood CD34⁺ cells, but impairs lymphomyeloid differentiation*. Blood, 2003. **101**(5): p. 1759-68.
22. Zhang, X.B., et al., *Differential effects of HOXB4 on nonhuman primate short- and long-term repopulating cells*. PLoS Med, 2006. **3**(5): p. e173.

Figure legends

Figure 1: Impact of first and second generation HoxB4 on clonogenic murine MK progenitors

A) Bone marrow cells from C57Bl/6 5-FU treated mice were cultured in pre-stimulation medium for 4 days, including 2 days in which they have been infected or not with different RT-GFP, RT-HoxB4wt or RT-HoxB4 with amino acid replacements, before being sorted for positive GFP expression. GFP+ cells were then cultured in medium promoting MK maturation. At days 0, 5 and 7, cell aliquots were plated in a clonogenic assay for 6 to 8 days before enumeration. B) CFU-MK and CFU-MIX colonies were evaluated on day 5 and C) 7. Overexpression of all HoxB4 constructs generated more CFU-MK and CFU-Mix colonies than GFP and untreated controls. N=2 experiments (4 mice per group)

Figure 2: In vivo platelet reconstitution with HoxB4 transduced cells

Bone marrow cells from C57Bl/6SJL 5-FU treated mice infected with RT-GFP, RT-HoxB4^{WT}, HoxB4^{L7A}, HoxB4^{Y23A} and HoxB4^{Y28A} or exposed to untransduced GP+E86 producer cells only were transplanted into C57Bl/6 lethally irradiated mice (850 cGy) supplemented with support normal bone marrow. Controls also consisted of unstimulated bone marrow alone. Every two weeks post-transplantation, mice peripheral blood was analyzed for platelet reconstitution using GFP expression and anti-CD41 antibody by flow cytometry. A) HoxB4^{L7A}, HoxB4^{Y23A} and HoxB4^{Y28A} were more effective at contributing to platelets reconstitution in comparison with HoxB4-wt and all controls. B), Mice transplanted with cells over expressing first or second generation RT-HoxB4, harboured lower total platelet counts than mice transplanted with RT-GFP cells, naives, or normal support bone marrow only. N=2 (4 mice per group)

Figure 3: Secondary bone marrow transplantation in limiting dilution conditions (LDA)

A) C57Bl/6 transplanted mice transplanted with first and second generation HoxB4 or GFP only construct transduced cells were sacrificed 16 weeks post-transplant, and chimerism in bone marrow was assessed by GFP expression using flow cytometry. Bone marrow engraftment was higher in mice receiving RT-HoxB4wt or second generation RT-HoxB4 cells in comparison to GFP and BM only controls. B) Percentage of GFP expression was used to adjust the number of bone marrow cells of each condition to be transferred in the second recipient mice based on CRU assay in limiting dilution in five groups (50, 10, 2, 0.4 and 0.08 CRU). Every three weeks post secondary transplantation, mice peripheral blood from the 50 CRU group was analyzed for platelet content using anti-CD41 antibody and GFP expression by flow cytometry. Bone marrow cells infected with second generation RT-HoxB4^{L7A}, HoxB4^{Y23A} and HoxB4^{Y28A} contributed most to platelet reconstitution in the first 6 weeks in secondary transplant mice in comparison to RT-HoxB4^{WT}, the RT-GFP and normal bone marrow controls. Also, the great majority of platelets at 12 weeks originated from cells over expressing RT-HoxB4^{L7A}, while HoxB4^{Y23A} and HoxB4^{Y28A} decreased at 9 weeks. (C) Total platelet counts in secondary transplants increased gradually and similarly over the first 12 weeks in all groups, except for mice transplanted with cells overexpressing RT-HoxB4^{L7A}, which remained with low platelet counts. N=2 (4 mice per group)

Figure 4: HSC frequency in the bone marrow

A) Mice were sacrificed 12 weeks post secondary transplantation and bone marrow cells were collected. Percentage of GFP expression was assessed by flow cytometry for each group, and positive mice were scored. Data were analyzed by ELDA to evaluate HSC frequency in bone marrow. HSC frequency in bone marrow was higher in mice transplanted with cells infected with first or second generation RT-HoxB4 in comparison with GFP control. HoxB4^{L7A} cells demonstrated the

highest HSC frequency. B) Table of HSC frequency in each RT-HoxB4 mice group. N=2 (4 mice per group)

Figure 5: Effect of human recombinant TAT-HoxB4 on MK expansion from cord blood HSCs

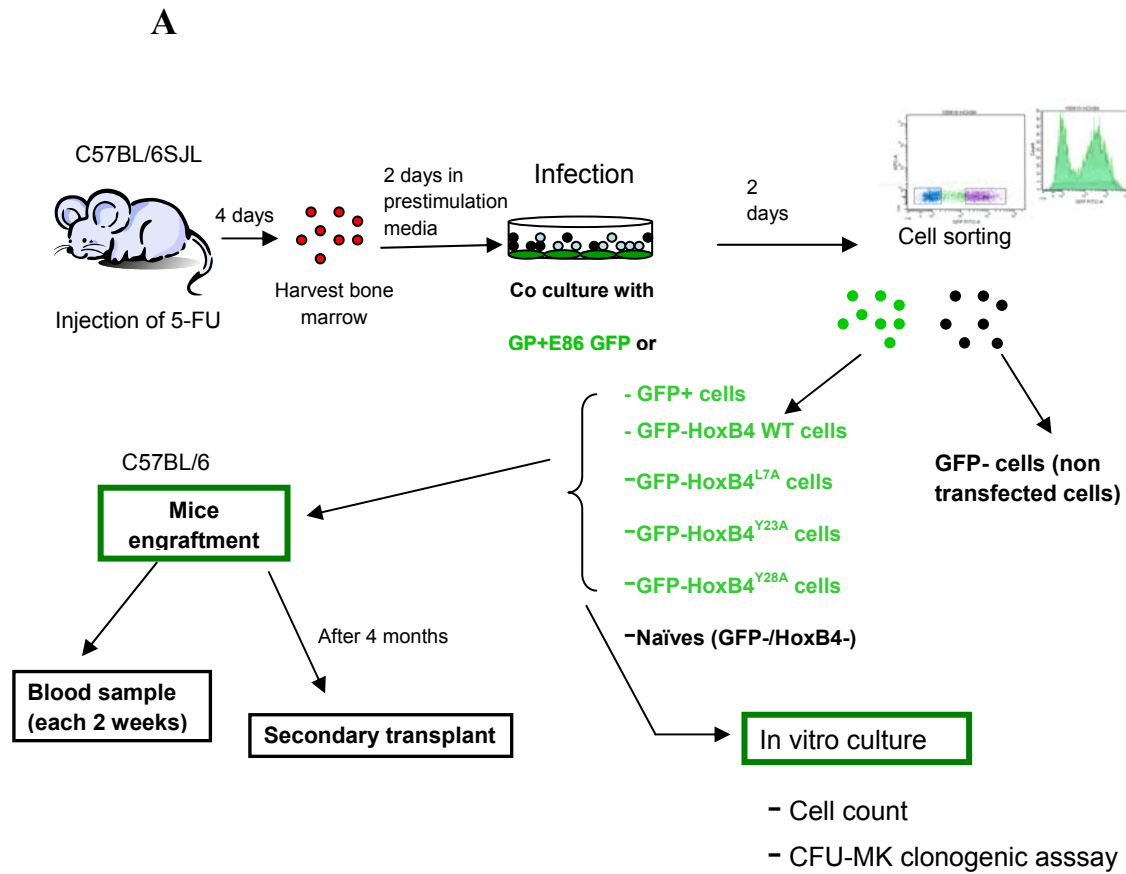
Purified CD34+ cells from umbilical cord blood were cultured for 14 days in vitro in BS1 MK optimized medium in association or not with 20 nM first or second generation recombinant TAT-HoxB4 protein added every 4 hours. A) Platelets were isolated at day 14 using a BSA gradient. Flow cytometry analysis of cells using forward (FSC) and side (SSC) scatter enabled to distinguish cells from platelets. B) All HoxB4 constructs yielded lower total cell numbers than untreated cells. C) On day 0, the overwhelming majority of cells were CD34+, with only ~1% CD41+ cells. D) The percentage of mature MK (CD41+/CD42+ cells) increased gradually over time in all treated and untreated conditions, reaching more than 70% at day 14. Clonogenic assays assessed MK and other progenitor cell production on days 0, 4 and 7. E) At days 4 and F) 7, absolute numbers of CFU-MK and CFU-Mix colonies were lower in cell cultures treated with TAT-HoxB4^{L7A}, TAT-HoxB4^{Y23A} and TAT-HoxB4^{Y28A}, in comparison to TAT-HoxB4^{WT} and untreated control. G) Isolated platelets at day 14 were evaluated for CD41 and CD42 expression using flow cytometry. Approximately 19 to 27% of platelets were CD41+, and 6 to 14% were both CD41+ and CD42+. Cells treated with the different second generation TAT-HoxB4 proteins had a tendency to produce a smaller proportion of CD41+CD42+ platelets, in comparison to cells treated with HoxB4^{WT} and untreated control. N=1

Figure 6: In vitro expansion of human progenitors from CD34+ patient cells

CD34+ purified cells from mobilised peripheral blood were cultured for 8 days in stem cell expansion media supplemented or not with 20 nM TAT-HoxB4

recombinant protein every 4 hours. Cells were analyzed for MK progenitors and mature cells at day 8 using anti-flow cytometry and clonogenic assays. HoxB4^{WT} generated a greater number of CFU-MK colonies and total CFU than untreated cells from 2 patients (Figure 6 A & C). In figure B and D, again in the two patients, A greater number of immature (CD34+) MK progenitors were produced in cultures treated with TAT-HoxB4 than untreated controls. N=2

Figure 1: Impact of first and second generation HoxB4 on clonogenic murine MK progenitors



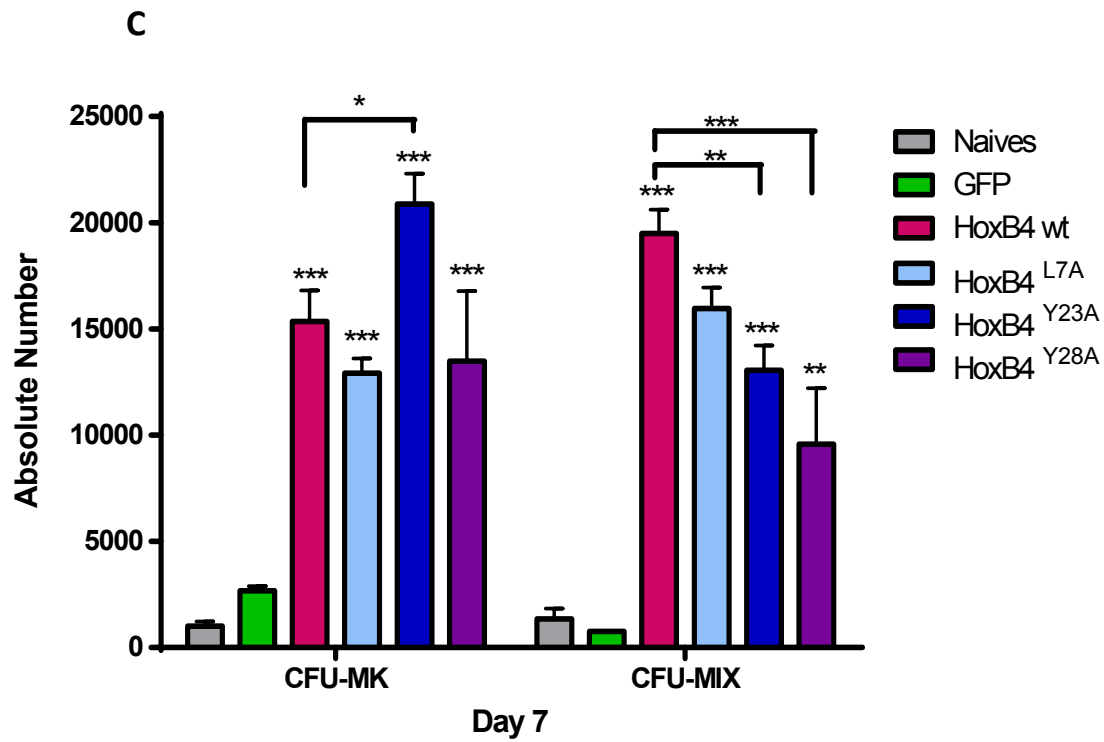
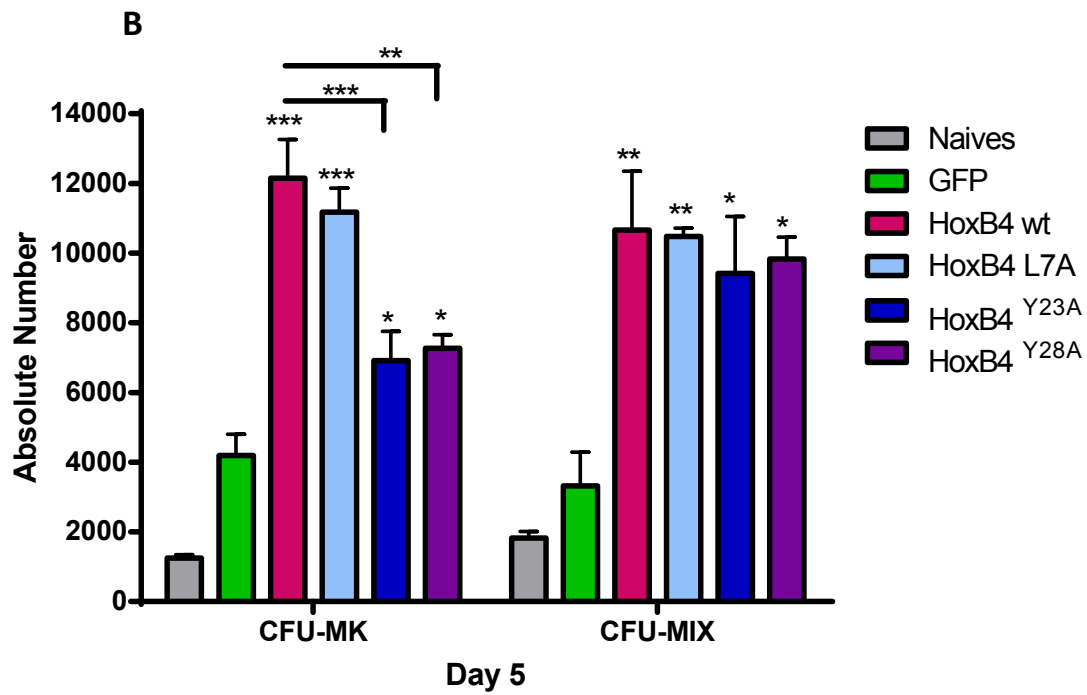


Figure 2: In vivo platelet reconstitution with HoxB4 transduced cells

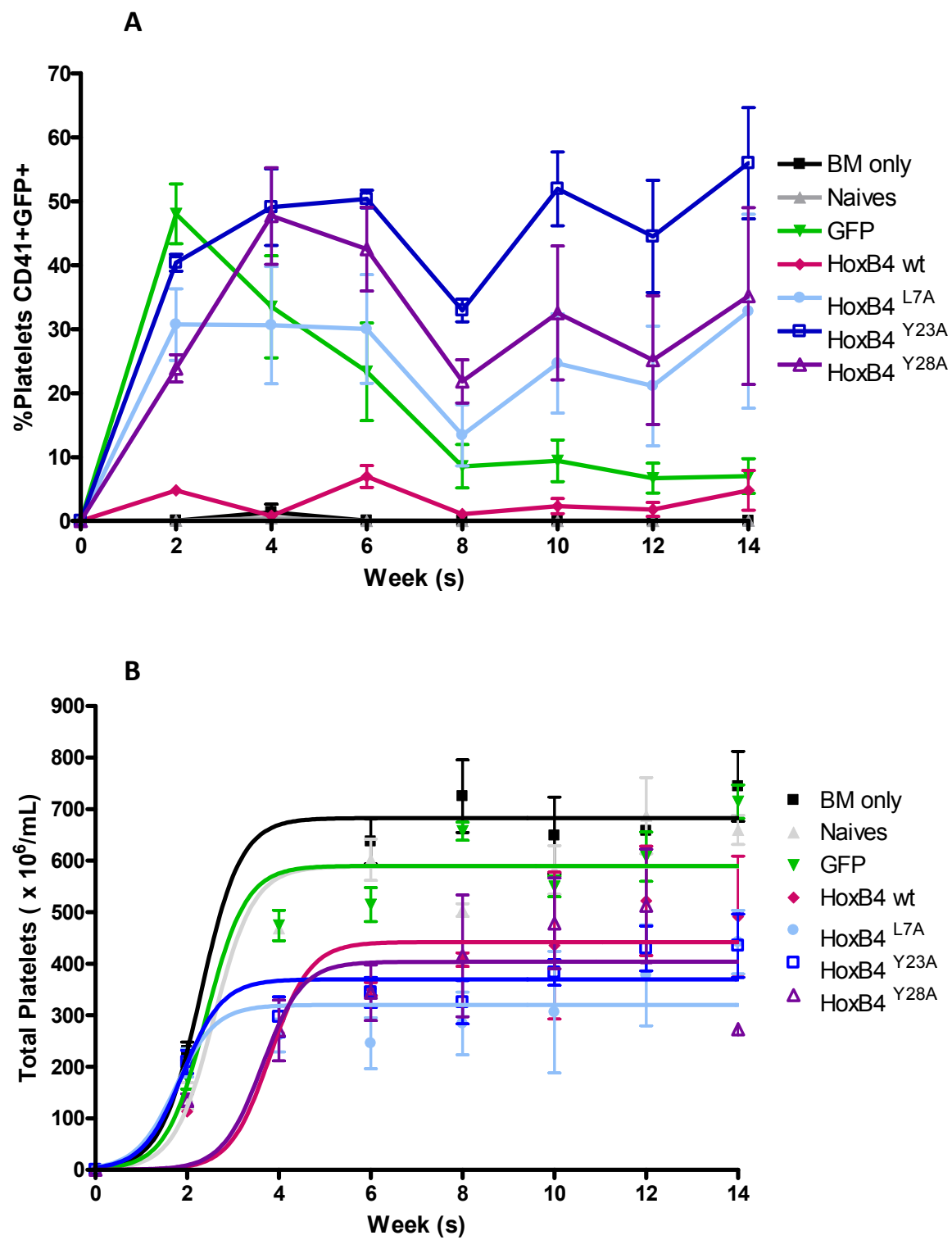


Figure 3: Secondary bone marrow transplantation in limiting dilution conditions (LDA)

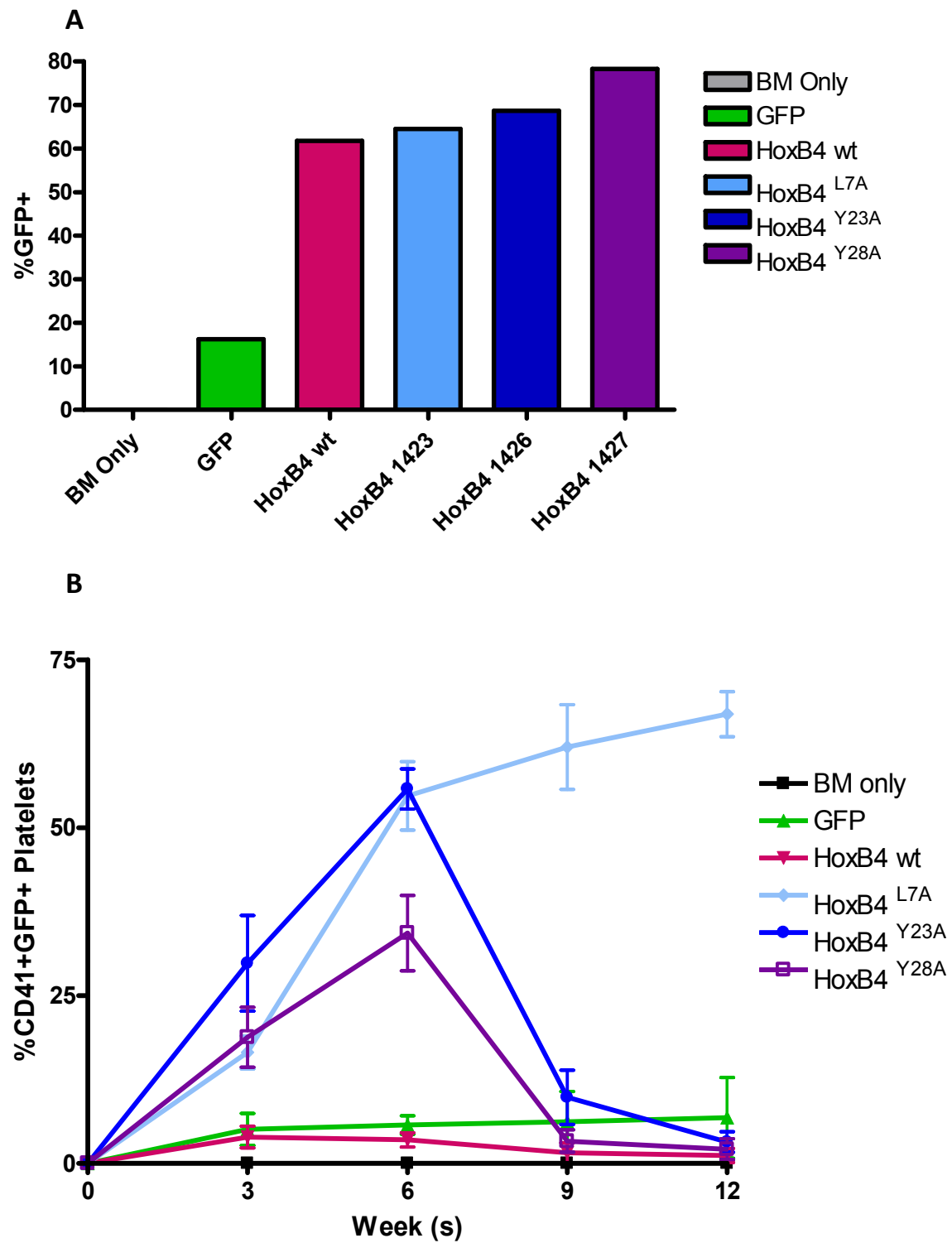


Figure 3: Secondary bone marrow transplantation in limiting dilution conditions (LDA)

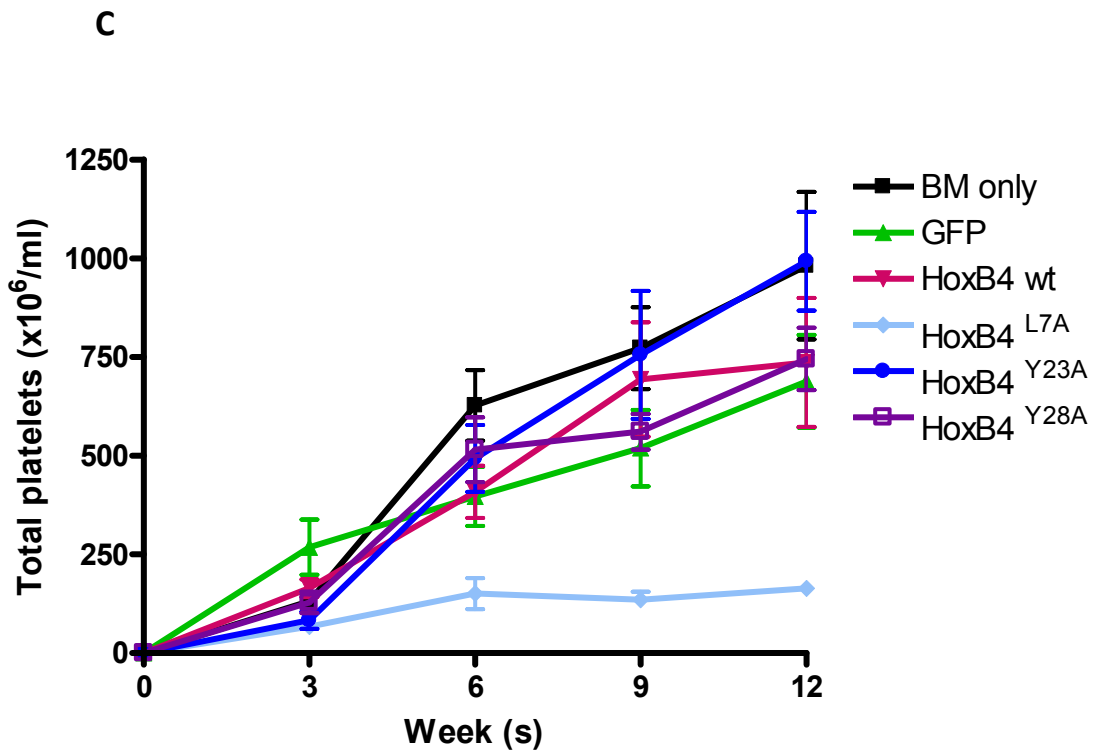
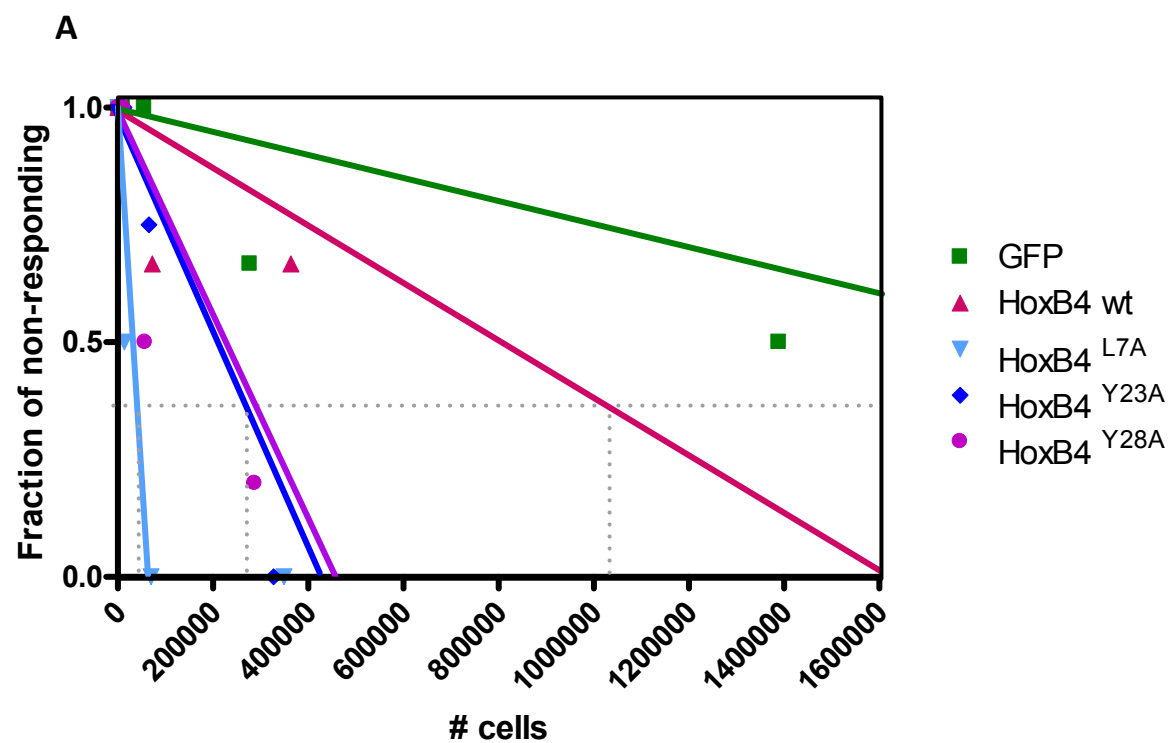


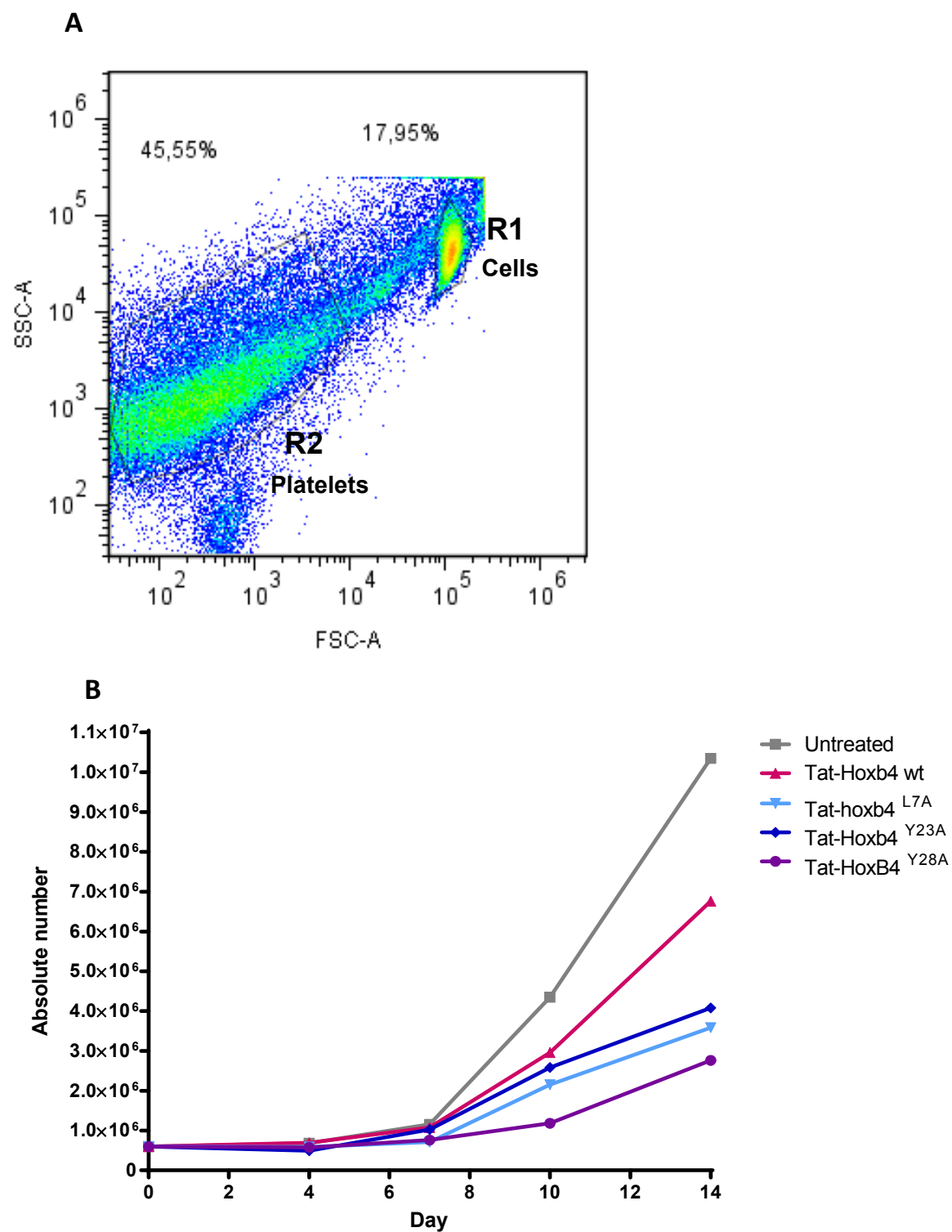
Figure 4: HSC frequency in the bone marrow

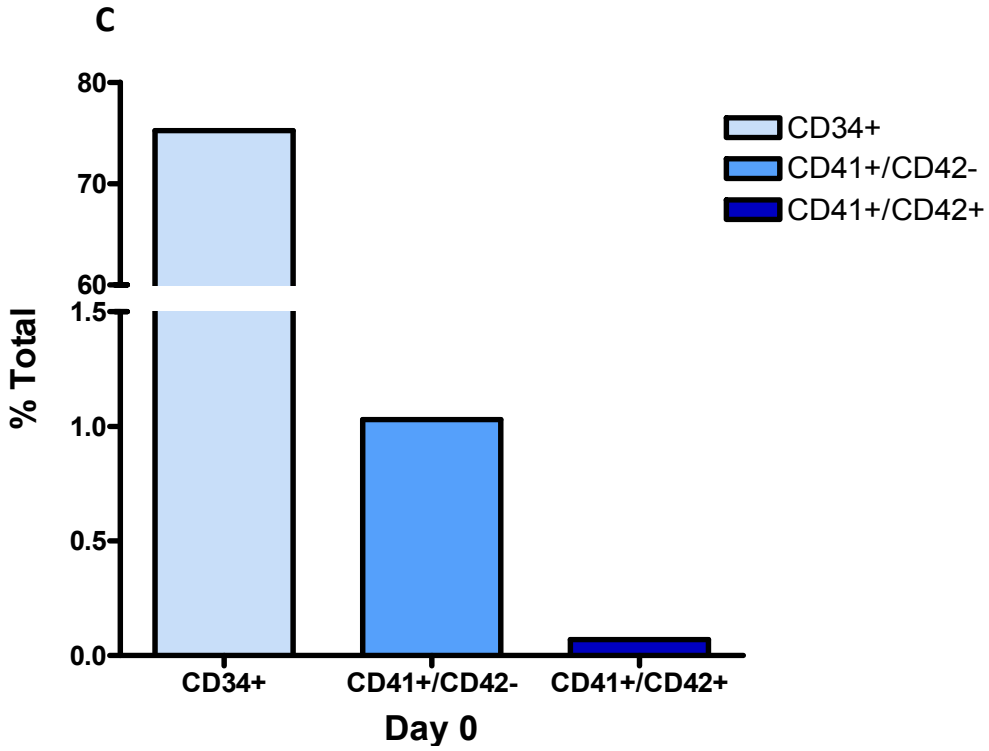


B

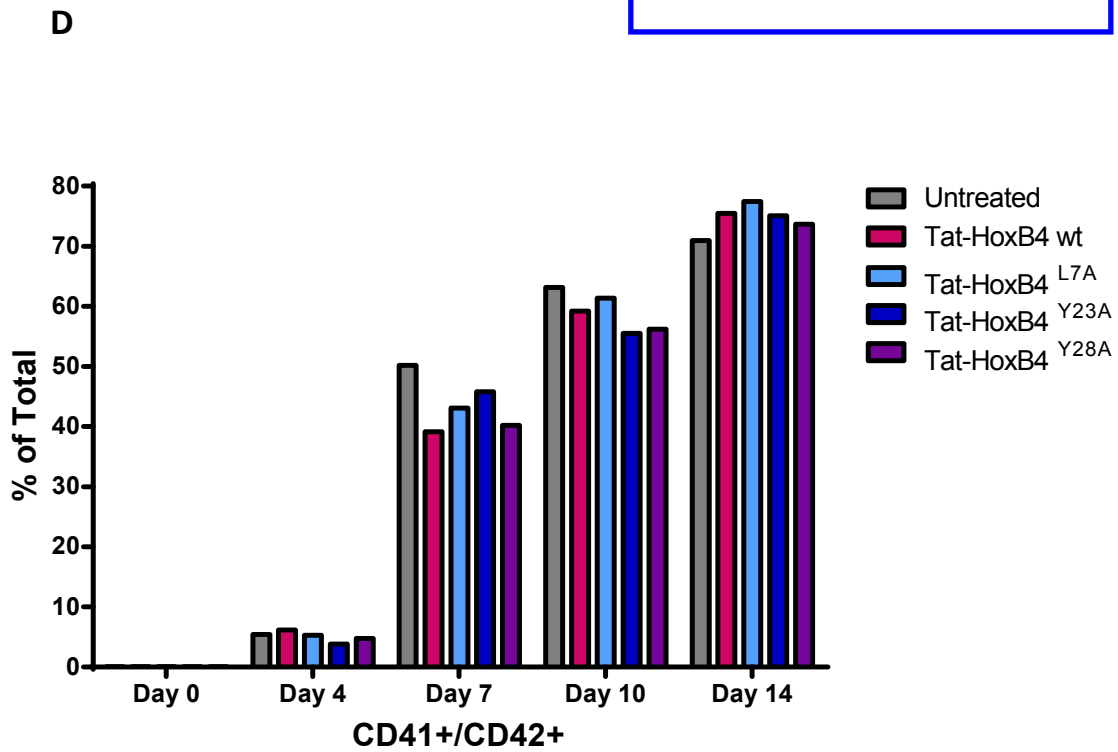
	Lower	Estimate	Upper	Fold Over GFP	Fold Over HoxB4 wt
GFP	3812112	1518549	604911	1,0	0,4
HoxB4 wt	1535359	550166	197141	2,8	1,0
HoxB4 ^{L7A}	55963	21349	8144	71,1	25,8
HoxB4 ^{Y23A}	371087	143324	55356	10,6	3,8
HoxB4 ^{Y28A}	374807	152953	62418	9,9	3,6

Figure 5: Effect of human recombinant TAT-HoxB4 on MK expansion from cord blood HSCs

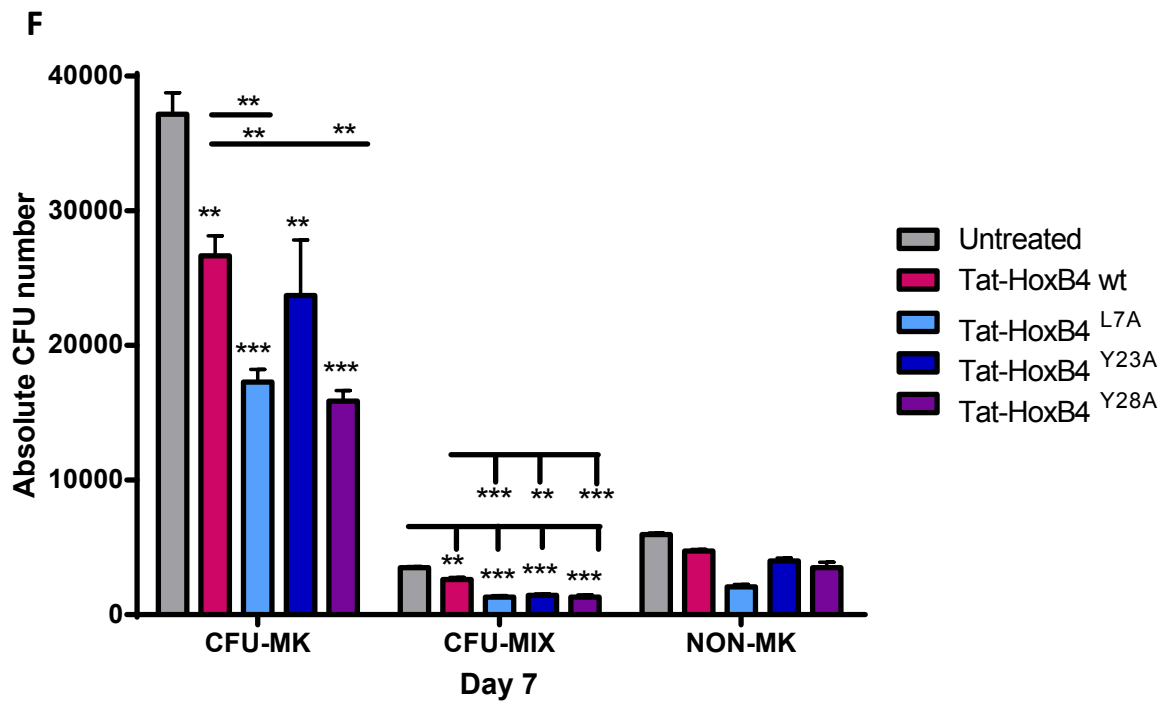
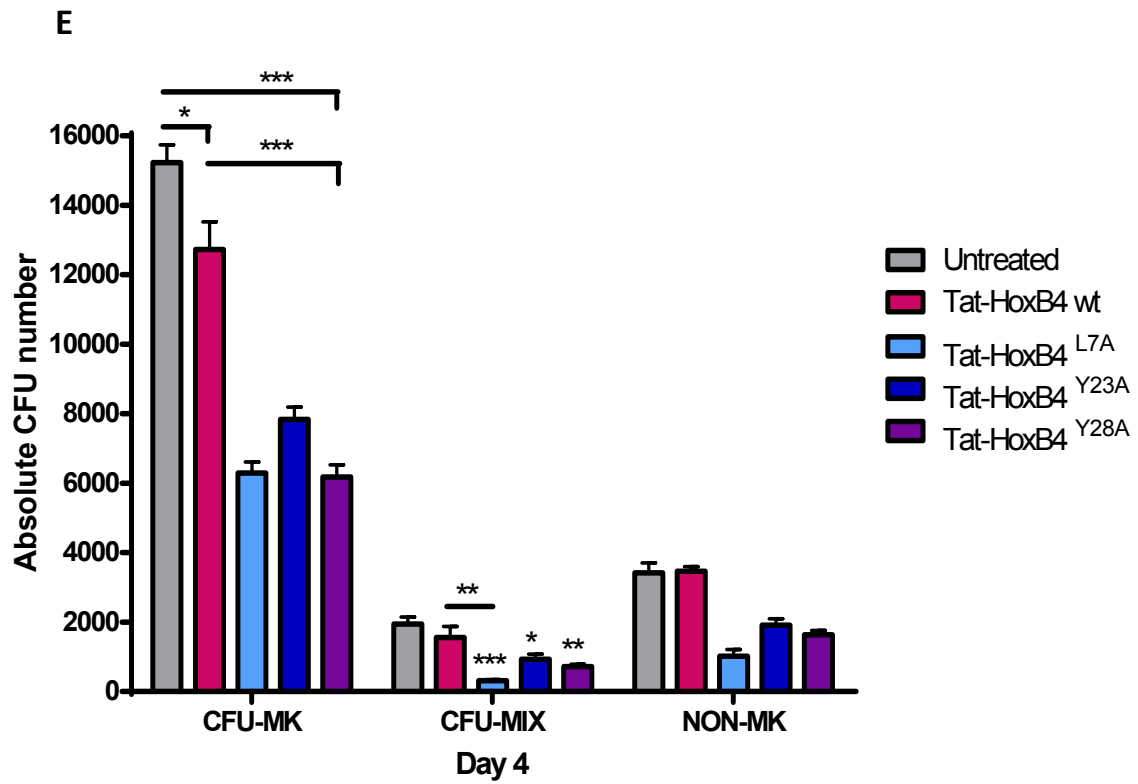




Gated on hematopoietic cells



Gated on hematopoietic cells



G

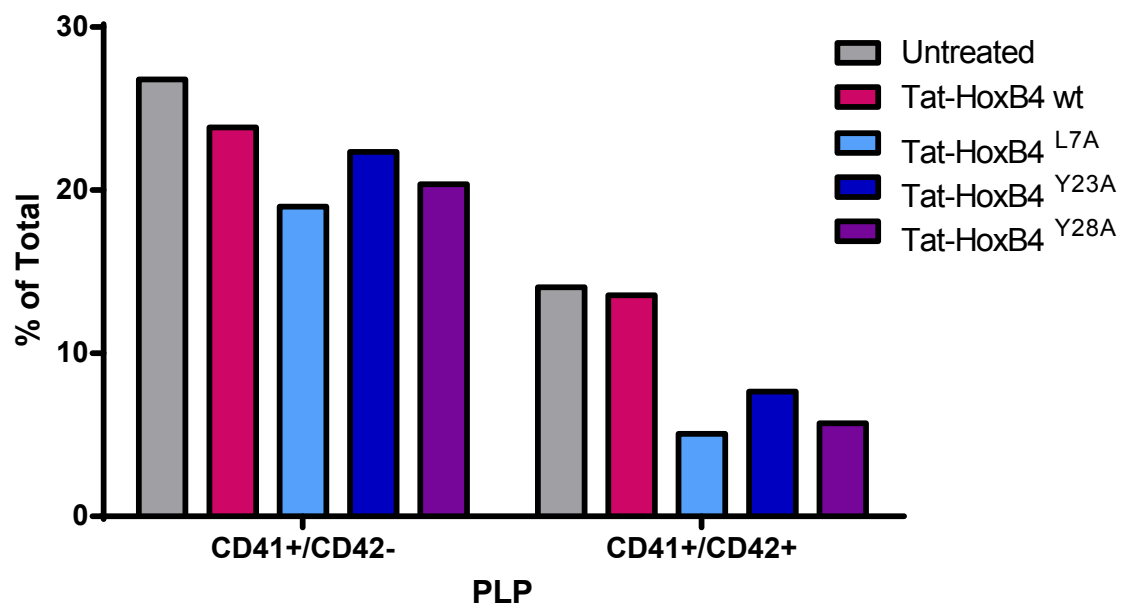
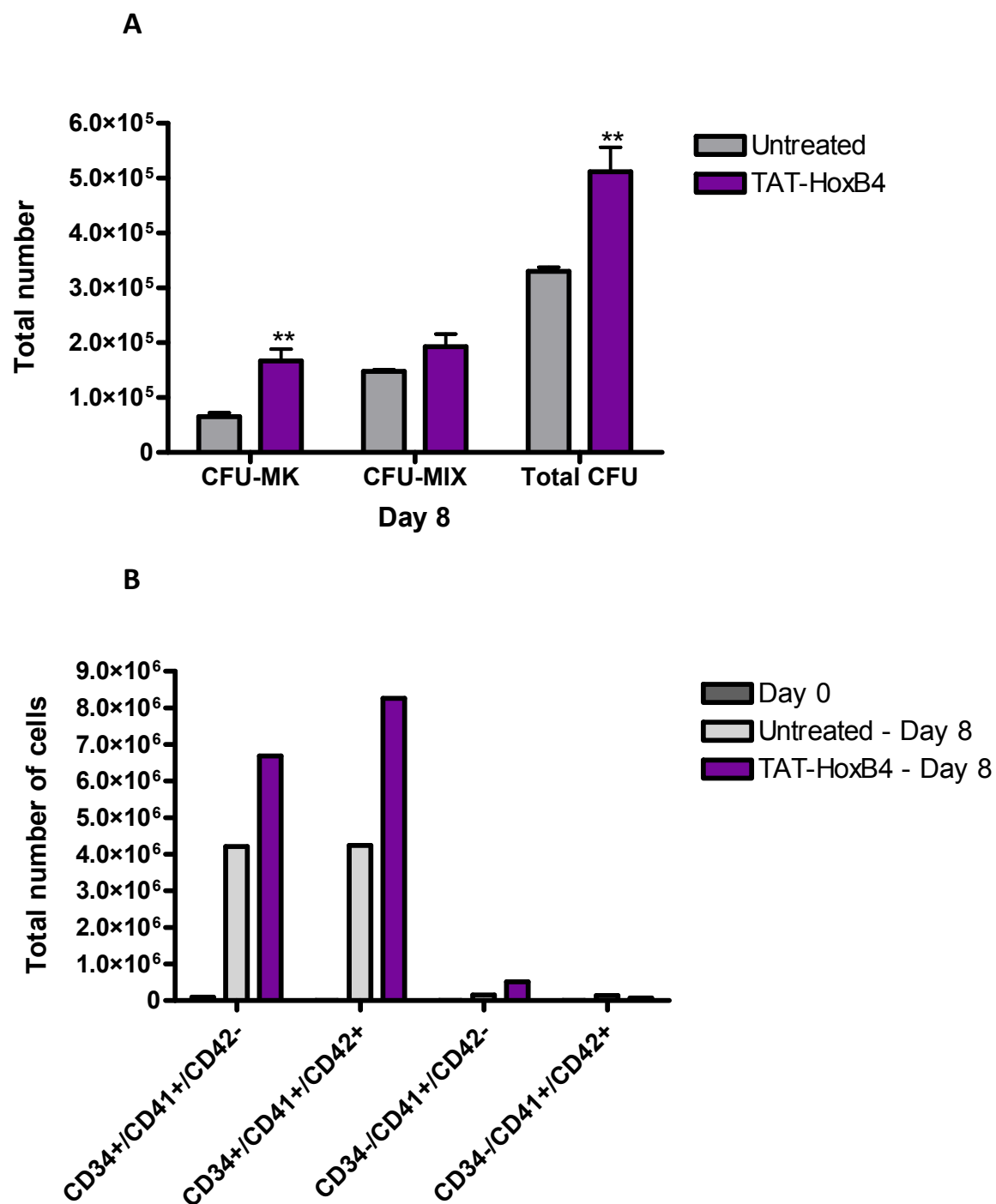
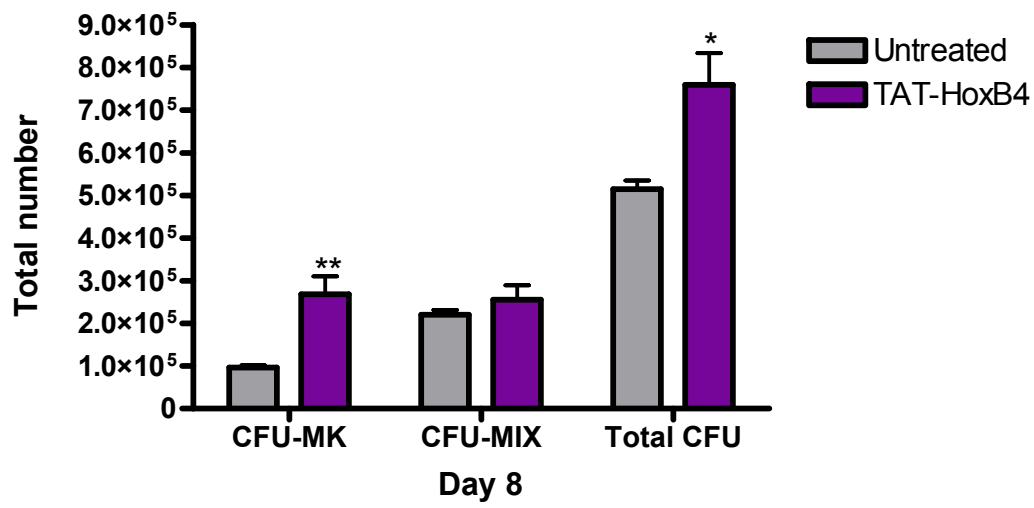


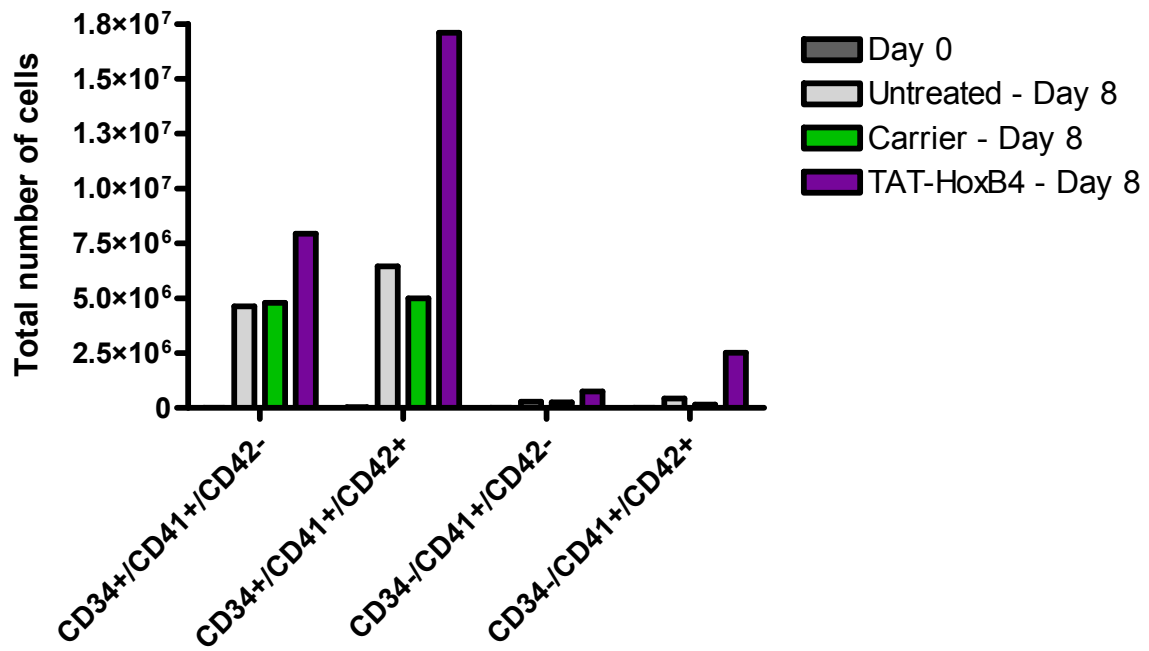
Figure 6: In vitro expansion of human progenitors from CD34+ patient cells



C



D



Discussion

Il a déjà été démontré que la protéine HoxB4 possède la capacité de promouvoir l'expansion et l'auto-renouvellement des CSH in vitro et in vivo [121, 122, 127, 133, 134]. Comme les CSH donnent entre autre naissance aux cellules de la lignée mégacaryocytaire et ultimement aux plaquettes [77], HoxB4 est certainement un bon candidat pour l'expansion de progéniteurs MK et l'accélération de la reconstitution plaquettaire. Alors, les protéines HoxB4 de seconde génération (L7A, Y23A, Y28A) ayant une stabilité intracellulaire augmentée devraient être d'autant plus efficaces à accélérer la reconstitution plaquettaire (Beslu et al en préparation).

Dans cette étude, nous avons d'abord voulu évaluer la capacité HoxB4^{WT} et de seconde génération à favoriser la lignée mégacaryocytaire et stimuler la reconstitution plaquettaire. Les résultats montrent que la surexpression d'une ou l'autre des protéines HoxB4 in vitro a pour effet de produire davantage de colonies MK et Mix en comparaison avec le contrôle GFP. Quand les cellules sont transférées in vivo dans un modèle murin, le niveau de plaquettes provenant de cellules surexprimant la protéine devrait refléter les résultats in vitro et résulter en un niveau de plaquettes élevé dans le sang. Néanmoins, ce n'est pas ce que nous avons observé [65, 69]. Au niveau de la reconstitution plaquettaire totale, les souris qui ont reçu de la moelle osseuse infectée par HoxB4^{WT} ou de seconde génération possèdent un taux de plaquettes très bas. Étrangement, les cellules provenant des cellules souches surexprimant les différentes protéines mutées contribuent davantage à la reconstitution plaquettaire. Il semble dans ce contexte que chaque MK mature produise un nombre de plaquettes inférieur à un MK normal ce qui expliquerait en partie le niveau total bas de plaquettes obtenu. Il est aussi possible que HoxB4^{WT} ou de seconde génération puisse jouer un rôle inhibiteur sur la production de plaquettes par les cellules endogènes de la souris, ce qui expliquerait le taux de plaquettes total beaucoup plus bas que la normale, malgré une contribution adéquate par les cellules HoxB4 infectées. Cependant, dans le cas de HoxB4^{WT}, les cellules semblent être complètement bloquées suite à leur différenciation au niveau

MK et incapables de produire des plaquettes, car leur contribution à la reconstitution est presque inexistante. Pour confirmer que la surexpression des protéines apporte un effet inhibiteur sur les cellules endogènes, il pourrait être intéressant de placer en co-culture des cellules de moelle osseuse non infectées avec des cellules de moelles infectées par un ou l'autres des HoxB4 et vérifier s'il y a toujours une production de plaquettes endogènes. Lorsque les souris ont été sacrifiées 4 mois après la transplantation, nous avons observé que les cellules de moelle osseuse surexprimant HoxB4^{WT} ou de seconde génération étaient présentes à un pourcentage très élevé dans la moelle de ces souris receveuses, démontrant que la reconstitution hématopoïétique de celles-ci était majoritairement effectuée par ces cellules injectées et non les cellules de moelle de support qui n'étaient pas infectées.

Le facteur de transcription HoxB4 est connu pour démontrer un effet sur les CSH à court et long terme, ainsi que sur les progéniteurs hématopoïétiques [122, 136]. Son impact a donc été évalué sur la reconstitution plaquettaire à long terme. De plus, nous voulions comparer son effet sur la production de CSH long terme, ainsi que sur la reconstitution hématopoïétique et plaquettaire avec les différentes protéines de seconde génération puisqu'elles ont une stabilité intracellulaire augmentée. Représentant la transplantation primaire, les cellules infectées par HoxB4 de seconde génération contribuent davantage à la reconstitution plaquettaire que les cellules HoxB4^{WT}. Contrairement à la transplantation primaire, au long terme, il semble que HoxB4 de seconde génération et sauvage n'empêchent pas la production de plaquettes endogènes par la souris, puisque le niveau de plaquettes total augmente graduellement pour finalement atteindre un taux normal, et ce même si les cellules HoxB4^{WT} ne semblent pas être aptes à se différencier en plaquettes. Il est intéressant de noter qu'une inhibition au niveau de la production de cellules lymphomyéloïdes a aussi été rapportée avec HoxB4 sauvage [137]. Cependant, HoxB4^{L7A} fait exception, en conservant un niveau de plaquettes

extrêmement bas. Étonnamment, on remarque que les cellules HoxB4^{L7A} sont celles qui contribuent en plus grand nombre et le plus longtemps à la reconstitution plaquettaire. Cela suggère donc que les cellules exprimant la protéine HoxB4^{L7A} ont une importante capacité de différenciation et de maturation en plaquettes [77]. Par contre, le nombre total de plaquettes mesuré se révèle très bas, ce qui pourrait être attribuable à un effet inhibiteur au niveau des plaquettes produites par les MK endogènes non infectés.

À la lumière des résultats obtenus lors de l'essai de transplantation secondaire en dilution limite, nous avons observé que les souris HoxB4 de seconde génération possèdent une fréquence de cellules souches à long terme beaucoup plus élevée que le contrôle et HoxB4^{WT}, même si HoxB4^{WT} a aussi une fréquence plus élevée que le contrôle. Cela démontre que HoxB4 de seconde génération, probablement à cause de sa stabilité intracellulaire améliorée, est capable d'induire une augmentation de l'auto-renouvellement et de l'expansion des CSH long terme et court terme in vivo en comparaison avec HoxB4^{WT} et le contrôle. Ce résultat est aligné avec les résultats obtenus à la suite de la transplantation primaire, où il y avait une très grande proportion de cellules HoxB4^{WT} et de seconde génération dans la moelle osseuse des souris comparativement au contrôle GFP.

Nous avons évalué l'effet des protéines recombinantes TAT-HoxB4^{WT} et de seconde génération sur l'expansion des progéniteurs MK in vitro, à partir de CSH purifiées de sang de cordon ombilical. Cette expérimentation n'a été effectuée qu'une seule fois, ceci représente donc des résultats préliminaires. Par contre, jusqu'à maintenant, ni la protéine sauvage ni aucune des protéines de seconde génération ne semble apporter d'effet bénéfique sur la production de MK. Ces résultats sont cohérents avec ceux observés dans l'essai clonogénique de progéniteurs MK, où il n'y avait pas de différence observable entre les cellules

traitées et non traitées au niveau de la production de colonies CFU-MK et CFU-Mix, il y avait même une diminution de ce dernier type de colonie. Durant la culture de 14 jours, pour le moment, nous pouvons affirmer qu'en général, il y a une maturation et différenciation adéquate des cellules pour graduellement atteindre un pourcentage de MK matures (CD41+/CD42+) élevé.

Par contre il n'y a pas de différence observable entre les cellules traitées et non traitées avec HoxB4. Le milieu de culture lui-même semble apporter aux cellules les facteurs nécessaires pour permettre la différenciation et la maturation en MK matures et en plaquettes. Les résultats sur les plaquettes isolées de la culture suggèrent aussi qu'il n'y a pas eu d'augmentation de production de plaquettes par les MK traités par rapport aux non traités. Une explication permettant d'expliquer ces résultats est que le milieu de culture basé sur un mélange de cytokines (BS1), est déjà optimisé et favoriser une maturation maximale des cellules vers la lignée mégacaryocytaire et vers la production de plaquettes, résultant en une forte production par le contrôle [95]. Dans des conditions où les CSHs sont cultivées dans un milieu conventionnel favorisant la production de cellules souches plutôt que les MK, un effet bénéfique de la protéine pourrait alors être observé. Nous avons donc évalué cette possibilité en utilisant des cellules souches et progénitrices humaines obtenues de patients avec une néoplasie hématologique qui ont subi un prélèvement de cellules souches à des fins de greffe autologue.

Pour évaluer la capacité de la protéine recombinante TAT-HoxB4 sauvage à accroître la production de progéniteurs mégacaryocytaires et de plaquettes dans un milieu de culture permettant d'exercer une activité biologique sur les CSH, nous avons étudié sa capacité à expandre les MK et ses progéniteurs in vitro à partir de CSH (CD34+) provenant de patients atteints de myélome multiple. Même si les cellules sont cultivées dans un milieu favorisant l'expansion de cellules souches,

les cellules traitées avec la protéine TAT-HoxB4^{WT} sont plus efficaces dans la production de cellules de la lignée mégacaryocytaire que les cellules non traitées. Cette observation suggère que la protéine TAT-HoxB4^{WT} est capable d'augmenter le taux d'auto-renouvellement ainsi que l'expansion des CSHs, et que l'accroissement d'un nombre initial de cellules pouvant se différencier en progéniteurs de différentes lignées, est à l'origine d'une production accrue de progéniteurs mégacaryocytaires et de MK matures en culture in vitro.

Conclusions et perspectives

Ni la surexpression de HoxB4^{WT} ni celle de HoxB4 de seconde génération avec une demi-vie prolongée, n'ont démontré une capacité d'amener un avantage significatif au niveau de la reconstitution plaquettaire dans un modèle in vivo murin. Par contre, une augmentation de la production de colonies MK matures et immatures in vitro a été observée avec ces différentes constructions. De plus, la surexpression de ces différentes protéines a significativement augmenté la fréquence de cellules souches à long terme dans la moelle osseuse, particulièrement lors de la surexpression des protéines de seconde génération, et ce de façon particulièrement importante avec HoxB4^{L7A}. Cependant, lorsque des CSH de sang de cordon ombilical ont été mises en culture dans des conditions optimisées pour l'expansion et la différenciation en MK, les protéines TAT-HoxB4 sauvage et de seconde génération n'ont pas été capables d'accroître la production mégacaryocytaire ou plaquettaire. Il est possible que ce résultat soit attribuable à l'utilisation d'un milieu de culture optimisé favorisant essentiellement la production de cellules MK matures et ne permettant pas aux protéines HoxB4 d'exercer leur rôle. Il demeure encourageant de constater que chez les deux patients étudiés, la protéine recombinante TAT-HoxB4^{WT} a amélioré la différenciation et la maturation des cellules souches vers des populations MK matures et immatures après 8 jours de traitement in vitro. L'ensemble de ces résultats démontre que les protéines recombinantes TAT-HoxB4 de seconde génération avec une stabilité de HoxB4 intracellulaire améliorée, ainsi que la protéine TAT-HoxB4^{WT} demeurent des outils prometteurs pour des thérapies visant à induire l'expansion de CSHs ou l'accélération de la reconstitution plaquettaire chez les patients atteints de différents désordres hématologiques.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Sharma, S., et al., *Stem cell c-KIT and HOXB4 genes: critical roles and mechanisms in self-renewal, proliferation, and differentiation*. Stem Cells Dev, 2006. **15**(6): p. 755-78.
2. Knoblich, J.A., *Mechanisms of asymmetric stem cell division*. Cell, 2008. **132**(4): p. 583-97.
3. Yamashita, Y.M. and M.T. Fuller, *Asymmetric centrosome behavior and the mechanisms of stem cell division*. J Cell Biol, 2008. **180**(2): p. 261-6.
4. Li, L. and T. Xie, *Stem cell niche: structure and function*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2005. **21**: p. 605-31.
5. Reubinoff, B.E., et al., *Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro*. Nat Biotechnol, 2000. **18**(4): p. 399-404.
6. Keller, G., *Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine*. Genes Dev, 2005. **19**(10): p. 1129-55.
7. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science, 1998. **282**(5391): p. 1145-7.
8. Catacchio, I., et al., *Evidence for bone marrow adult stem cell plasticity: properties, molecular mechanisms, negative aspects, and clinical applications of hematopoietic and mesenchymal stem cells transdifferentiation*. Stem Cells Int, 2013. **2013**: p. 589139.
9. Sanguinetti, A., G. Bistoni, and N. Avenia, *Stem cells and breast cancer, where we are? A concise review of literature*. G Chir, 2011. **32**(10): p. 438-46.
10. Orkin, S.H. and L.I. Zon, *Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology*. Cell, 2008. **132**(4): p. 631-44.
11. Orkin, S.H., *Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages*. Nat Rev Genet, 2000. **1**(1): p. 57-64.
12. Christensen, J.L. and I.L. Weissman, *Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(25): p. 14541-6.

13. Papathanasiou, P., et al., *Evaluation of the long-term reconstituting subset of hematopoietic stem cells with CD150*. Stem Cells, 2009. **27**(10): p. 2498-508.
14. Yang, L., et al., *Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients*. Blood, 2005. **105**(7): p. 2717-23.
15. Gangenahalli, G.U., et al., *Hematopoietic stem cell antigen CD34: role in adhesion or homing*. Stem Cells Dev, 2006. **15**(3): p. 305-13.
16. Berenson, R.J., et al., *Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons*. J Clin Invest, 1988. **81**(3): p. 951-5.
17. Burt, R.K., *Clinical utility in maximizing CD34+ cell count in stem cell grafts*. Stem Cells, 1999. **17**(6): p. 373-6.
18. McKenzie, J.L., et al., *Low rhodamine 123 retention identifies long-term human hematopoietic stem cells within the Lin-CD34+CD38- population*. Blood, 2007. **109**(2): p. 543-5.
19. Geraerts, M. and C.M. Verfaillie, *Adult stem and progenitor cells*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2009. **114**: p. 1-21.
20. Doulatov, S., et al., *Hematopoiesis: a human perspective*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(2): p. 120-36.
21. Aversa, F., Y. Reisner, and M.F. Martelli, *Hematopoietic stem cell transplantation from alternative sources in adults with high-risk acute leukemia*. Blood Cells Mol Dis, 2004. **33**(3): p. 294-302.
22. Pavletic, Z.S., et al., *Hematopoietic recovery after allogeneic blood stem-cell transplantation compared with bone marrow transplantation in patients with hematologic malignancies*. J Clin Oncol, 1997. **15**(4): p. 1608-16.
23. Petit, I., et al., *G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4*. Nat Immunol, 2002. **3**(7): p. 687-94.
24. Chabannon, C., et al., *[New molecular targets and new clinical practices for hematopoietic stem cell mobilization]*. Bull Cancer, 2011. **98**(8): p. 951-61.
25. To, L.B., et al., *The biology and clinical uses of blood stem cells*. Blood, 1997. **89**(7): p. 2233-58.

26. Thomas, J., F. Liu, and D.C. Link, *Mechanisms of mobilization of hematopoietic progenitors with granulocyte colony-stimulating factor*. Curr Opin Hematol, 2002. **9**(3): p. 183-9.
27. Watanabe, T., et al., *GM-CSF-mobilized peripheral blood CD34+ cells differ from steady-state bone marrow CD34+ cells in adhesion molecule expression*. Bone Marrow Transplant, 1997. **19**(12): p. 1175-81.
28. Koenigsman, M., et al., *The role of diagnosis in patients failing peripheral blood progenitor cell mobilization*. Transfusion, 2004. **44**(5): p. 777-84.
29. Perseghin, P., et al., *Management of poor peripheral blood stem cell mobilization: incidence, predictive factors, alternative strategies and outcome. A retrospective analysis on 2177 patients from three major Italian institutions*. Transfus Apher Sci, 2009. **41**(1): p. 33-7.
30. Magenau, J. and D.R. Couriel, *Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia: To Whom, When, and How*. Curr Oncol Rep, 2013.
31. Wagner, J.E. and E. Gluckman, *Umbilical cord blood transplantation: the first 20 years*. Semin Hematol, 2010. **47**(1): p. 3-12.
32. Smith, A.R. and J.E. Wagner, *Alternative haematopoietic stem cell sources for transplantation: place of umbilical cord blood*. Br J Haematol, 2009. **147**(2): p. 246-61.
33. Tse, W., K.D. Bunting, and M.J. Laughlin, *New insights into cord blood stem cell transplantation*. Curr Opin Hematol, 2008. **15**(4): p. 279-84.
34. Gluckman, E., *Hematopoietic stem-cell transplants using umbilical-cord blood*. N Engl J Med, 2001. **344**(24): p. 1860-1.
35. Delaney, M. and K.K. Ballen, *Umbilical Cord Blood Transplantation: Review of Factors Affecting the Hospitalized Patient*. J Intensive Care Med, 2013.
36. Rocha, V., et al., *Double cord blood transplantation: extending the use of unrelated umbilical cord blood cells for patients with hematological diseases*. Best Pract Res Clin Haematol, 2010. **23**(2): p. 223-9.
37. Ballen, K.K., *New trends in umbilical cord blood transplantation*. Blood, 2005. **105**(10): p. 3786-92.
38. Ballen, K.K., E. Gluckman, and H.E. Broxmeyer, *Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond*. Blood, 2013. **122**(4): p. 491-8.

39. Nagler, A., et al., *Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia in Remission: Comparison of Intravenous Busulfan Plus Cyclophosphamide (Cy) Versus Total-Body Irradiation Plus Cy As Conditioning Regimen--A Report From the Acute Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation*. J Clin Oncol, 2013.
40. Liu, Y.C., et al., *Comparisons between allogeneic peripheral blood stem cell transplantation and allogeneic bone marrow transplantation in adult hematologic disease: a single center experience*. Kaohsiung J Med Sci, 2003. **19**(11): p. 541-8.
41. Talmadge, J.E., *Hematopoietic stem cell graft manipulation as a mechanism of immunotherapy*. Int Immunopharmacol, 2003. **3**(8): p. 1121-43.
42. Cassaday, R.D. and A.K. Gopal, *Allogeneic hematopoietic cell transplantation in mantle cell lymphoma*. Best Pract Res Clin Haematol, 2012. **25**(2): p. 165-74.
43. Petersen, S.L., *Alloreactivity as therapeutic principle in the treatment of hematologic malignancies. Studies of clinical and immunologic aspects of allogeneic hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning*. Dan Med Bull, 2007. **54**(2): p. 112-39.
44. Boyiadzis, M. and S. Pavletic, *Haematopoietic stem cell transplantation: indications, clinical developments and future directions*. Expert Opin Pharmacother, 2004. **5**(1): p. 97-108.
45. Fuchs, E.J., *Haploidentical transplantation for hematologic malignancies: where do we stand?* Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2012. **2012**: p. 230-6.
46. Peffault de Latour, R., A. Cabrespine-Faugeras, and J.O. Bay, *[Ten years of changes in conditioning regimen for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adults]*. Bull Cancer, 2008. **95**(1): p. 87-97.
47. Appelbaum, F.R., *Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 385-9.
48. Nishimori, H., Y. Maeda, and M. Tanimoto, *Chronic graft-versus-host disease: disease biology and novel therapeutic strategies*. Acta Med Okayama, 2013. **67**(1): p. 1-8.
49. Smeland, K.B., et al., *High-dose therapy with autologous stem cell support for lymphoma--from experimental to standard treatment*. Tidsskr Nor Laegeforen, 2013. **133**(16): p. 1735-9.
50. Child, J.A., et al., *High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma*. N Engl J Med, 2003. **348**(19): p. 1875-83.

51. Attal, M., et al., *A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome*. N Engl J Med, 1996. **335**(2): p. 91-7.
52. Beckers, M.M., et al., *[Autologous stem cell transplantation in haematological disorders,1980-2002]*. Ned Tijdschr Geneesk, 2010. **154**: p. A2025.
53. Othieno-Abinya, N.A., A. Waweru, and L.O. Nyabola, *Chemotherapy induced myelosuppression*. East Afr Med J, 2007. **84**(1): p. 8-15.
54. Testart-Paillet, D., et al., *Contribution of modelling chemotherapy-induced hematological toxicity for clinical practice*. Crit Rev Oncol Hematol, 2007. **63**(1): p. 1-11.
55. Montoya, L., *Managing hematologic toxicities in the oncology patient*. J Infus Nurs, 2007. **30**(3): p. 168-72.
56. Vadhan-Raj, S., *Management of chemotherapy-induced thrombocytopenia: current status of thrombopoietic agents*. Semin Hematol, 2009. **46**(1 Suppl 2): p. S26-32.
57. Blay, J.Y., et al., *A risk model for thrombocytopenia requiring platelet transfusion after cytotoxic chemotherapy*. Blood, 1998. **92**(2): p. 405-10.
58. Kuter, D.J. and C.G. Begley, *Recombinant human thrombopoietin: basic biology and evaluation of clinical studies*. Blood, 2002. **100**(10): p. 3457-69.
59. Franchini, M., et al., *Bleeding complications in patients with hematologic malignancies*. Semin Thromb Hemost, 2013. **39**(1): p. 94-100.
60. Blajchman, M.A., et al., *New strategies for the optimal use of platelet transfusions*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2008: p. 198-204.
61. Josephson, C.D., et al., *ABO-mismatched platelet transfusions: strategies to mitigate patient exposure to naturally occurring hemolytic antibodies*. Transfus Apher Sci, 2010. **42**(1): p. 83-8.
62. Heal, J.M. and N. Blumberg, *Optimizing platelet transfusion therapy*. Blood Rev, 2004. **18**(3): p. 149-65.
63. Dunbar, N.M., D.L. Ornstein, and L.J. Dumont, *ABO incompatible platelets: risks versus benefit*. Curr Opin Hematol, 2012. **19**(6): p. 475-9.
64. Blumberg, N., J.M. Heal, and G.L. Phillips, *Platelet transfusions: trigger, dose, benefits, and risks*. F1000 Med Rep, 2010. **2**: p. 5.

65. Kaushansky, K., *Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis*. Blood, 2008. **111**(3): p. 981-6.
66. Avecilla, S.T., et al., *Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis*. Nat Med, 2004. **10**(1): p. 64-71.
67. Ravid, K., et al., *Roads to polyploidy: the megakaryocyte example*. J Cell Physiol, 2002. **190**(1): p. 7-20.
68. Vitrat, N., et al., *Endomitosis of human megakaryocytes are due to abortive mitosis*. Blood, 1998. **91**(10): p. 3711-23.
69. Bluteau, D., et al., *Regulation of megakaryocyte maturation and platelet formation*. J Thromb Haemost, 2009. **7 Suppl 1**: p. 227-34.
70. Italiano, J.E., Jr., et al., *Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes*. J Cell Biol, 1999. **147**(6): p. 1299-312.
71. Italiano, J.E., Jr., S. Patel-Hett, and J.H. Hartwig, *Mechanics of proplatelet elaboration*. J Thromb Haemost, 2007. **5 Suppl 1**: p. 18-23.
72. Deutsch, V.R. and A. Tomer, *Megakaryocyte development and platelet production*. Br J Haematol, 2006. **134**(5): p. 453-66.
73. Zauli, G., et al., *In vitro senescence and apoptotic cell death of human megakaryocytes*. Blood, 1997. **90**(6): p. 2234-43.
74. Radley, J.M. and C.J. Haller, *Fate of senescent megakaryocytes in the bone marrow*. Br J Haematol, 1983. **53**(2): p. 277-87.
75. Bonnet, D., *Hematopoietic stem cells*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2003. **69**(3): p. 219-29.
76. Hintze, C., et al., *Platelet Precursor Cells Can Be Generated from Cultured Human CD34+ Progenitor Cells But Display Recirculation into Hematopoietic Tissue upon Transfusion in Mice*. Transfus Med Hemother, 2010. **37**(4): p. 185-190.
77. Chang, Y., et al., *From hematopoietic stem cells to platelets*. J Thromb Haemost, 2007. **5 Suppl 1**: p. 318-27.
78. Reems, J.A., N. Pineault, and S. Sun, *In vitro megakaryocyte production and platelet biogenesis: state of the art*. Transfus Med Rev, 2010. **24**(1): p. 33-43.

79. Choi, E.S., et al., *Platelets generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional*. Blood, 1995. **85**(2): p. 402-13.
80. Norol, F., et al., *Effects of cytokines on platelet production from blood and marrow CD34+ cells*. Blood, 1998. **91**(3): p. 830-43.
81. Bartley, T.D., et al., *Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl*. Cell, 1994. **77**(7): p. 1117-24.
82. Kaushansky, K., *Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production*. Blood, 1995. **86**(2): p. 419-31.
83. Zucker-Franklin, D. and K. Kaushansky, *Effect of thrombopoietin on the development of megakaryocytes and platelets: an ultrastructural analysis*. Blood, 1996. **88**(5): p. 1632-8.
84. Hagiwara, T., et al., *Proliferative properties of human umbilical cord blood megakaryocyte progenitor cells to human thrombopoietin*. Exp Hematol, 1998. **26**(3): p. 228-35.
85. Horie, K., et al., *Action of thrombopoietin at the megakaryocyte progenitor level is critical for the subsequent proplatelet production*. Exp Hematol, 1997. **25**(2): p. 169-76.
86. Williams, J.L., et al., *Thrombopoietin requires additional megakaryocyte-active cytokines for optimal ex vivo expansion of megakaryocyte precursor cells*. Blood, 1998. **91**(11): p. 4118-26.
87. Kie, J.H., et al., *Decrease in apoptosis and increase in polyploidization of megakaryocytes by stem cell factor during ex vivo expansion of human cord blood CD34+ cells using thrombopoietin*. Stem Cells, 2002. **20**(1): p. 73-9.
88. Broudy, V.C., N.L. Lin, and K. Kaushansky, *Thrombopoietin (c-mpl ligand) acts synergistically with erythropoietin, stem cell factor, and interleukin-11 to enhance murine megakaryocyte colony growth and increases megakaryocyte ploidy in vitro*. Blood, 1995. **85**(7): p. 1719-26.
89. Teramura, M., et al., *Interleukin-11 enhances human megakaryocytopoiesis in vitro*. Blood, 1992. **79**(2): p. 327-31.
90. Fujiki, H., et al., *Role of human interleukin-9 as a megakaryocyte potentiator in culture*. Exp Hematol, 2002. **30**(12): p. 1373-80.

91. Muraoka, K., et al., *Thrombopoietin-independent effect of interferon-gamma on the proliferation of human megakaryocyte progenitors*. Br J Haematol, 1997. **98**(2): p. 265-73.
92. Yang, M., et al., *Expression of interleukin (IL) 1 type I and type II receptors in megakaryocytic cells and enhancing effects of IL-1beta on megakaryocytopoiesis and NF-E2 expression*. Br J Haematol, 2000. **111**(1): p. 371-80.
93. Sigurjonsson, O.E., et al., *Flt3/Flk-2-ligand in synergy with thrombopoietin delays megakaryocyte development and increases the numbers of megakaryocyte progenitor cells in serum-free cultures initiated with CD34+ cells*. J Hematother Stem Cell Res, 2002. **11**(2): p. 389-400.
94. Proulx, C., et al., *Preferential ex vivo expansion of megakaryocytes from human cord blood CD34+-enriched cells in the presence of thrombopoietin and limiting amounts of stem cell factor and Flt-3 ligand*. J Hematother Stem Cell Res, 2003. **12**(2): p. 179-88.
95. Cortin, V., et al., *Efficient in vitro megakaryocyte maturation using cytokine cocktails optimized by statistical experimental design*. Exp Hematol, 2005. **33**(10): p. 1182-91.
96. Nayak, M.K., P.P. Kulkarni, and D. Dash, *Regulatory role of proteasome in determination of platelet life span*. J Biol Chem, 2013. **288**(10): p. 6826-34.
97. Mason, K.D., et al., *Programmed anuclear cell death delimits platelet life span*. Cell, 2007. **128**(6): p. 1173-86.
98. Versteeg, H.H., et al., *New fundamentals in hemostasis*. Physiol Rev, 2013. **93**(1): p. 327-58.
99. Packham, M.A., *Role of platelets in thrombosis and hemostasis*. Can J Physiol Pharmacol, 1994. **72**(3): p. 278-84.
100. de Gaetano, G., *Historical overview of the role of platelets in hemostasis and thrombosis*. Haematologica, 2001. **86**(4): p. 349-56.
101. Aslan, J.E., et al., *Platelet shape change and spreading*. Methods Mol Biol, 2012. **788**: p. 91-100.
102. Gear, A.R., *Platelet adhesion, shape change, and aggregation: rapid initiation and signal transduction events*. Can J Physiol Pharmacol, 1994. **72**(3): p. 285-94.

103. Jennings, L.K., *Role of platelets in atherothrombosis*. Am J Cardiol, 2009. **103**(3 Suppl): p. 4A-10A.
104. Thon, J.N. and J.E. Italiano, *Platelets: production, morphology and ultrastructure*. Handb Exp Pharmacol, 2012(210): p. 3-22.
105. Calaminus, S.D., et al., *Identification of a novel, actin-rich structure, the actin nodule, in the early stages of platelet spreading*. J Thromb Haemost, 2008. **6**(11): p. 1944-52.
106. Andrews, R.K. and M.C. Berndt, *Platelet physiology and thrombosis*. Thromb Res, 2004. **114**(5-6): p. 447-53.
107. Fullard, J.F., *The role of the platelet glycoprotein IIb/IIIa in thrombosis and haemostasis*. Curr Pharm Des, 2004. **10**(14): p. 1567-76.
108. Watson, S.P., et al., *GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(8): p. 1752-62.
109. Reininger, A.J., *Function of von Willebrand factor in haemostasis and thrombosis*. Haemophilia, 2008. **14 Suppl 5**: p. 11-26.
110. Adam, F., et al., *Thrombin interaction with platelet membrane glycoprotein Ib alpha*. Trends Mol Med, 2003. **9**(11): p. 461-4.
111. Semple, J.W., J.E. Italiano, Jr., and J. Freedman, *Platelets and the immune continuum*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(4): p. 264-74.
112. Blair, P. and R. Flaumenhaft, *Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates*. Blood Rev, 2009. **23**(4): p. 177-89.
113. Krijgsveld, J., et al., *Thrombocidins, microbicidal proteins from human blood platelets, are C-terminal deletion products of CXC chemokines*. J Biol Chem, 2000. **275**(27): p. 20374-81.
114. Shiraki, R., et al., *Expression of Toll-like receptors on human platelets*. Thromb Res, 2004. **113**(6): p. 379-85.
115. McMorran, B.J., et al., *Platelets kill intraerythrocytic malarial parasites and mediate survival to infection*. Science, 2009. **323**(5915): p. 797-800.
116. Iannacone, M., et al., *Platelets mediate cytotoxic T lymphocyte-induced liver damage*. Nat Med, 2005. **11**(11): p. 1167-9.

117. Davi, G. and C. Patrono, *Platelet activation and atherothrombosis*. N Engl J Med, 2007. **357**(24): p. 2482-94.
118. May, A.E., P. Seizer, and M. Gawaz, *Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(3): p. s5-10.
119. Langer, H.F., et al., *Platelets recruit human dendritic cells via Mac-1/JAM-C interaction and modulate dendritic cell function in vitro*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(6): p. 1463-70.
120. Morgan, R., R. Pettengell, and J. Sohal, *The double life of HOXB4*. FEBS Lett, 2004. **578**(1-2): p. 1-4.
121. Antonchuk, J., G. Sauvageau, and R.K. Humphries, *HOXB4 overexpression mediates very rapid stem cell regeneration and competitive hematopoietic repopulation*. Exp Hematol, 2001. **29**(9): p. 1125-34.
122. Antonchuk, J., G. Sauvageau, and R.K. Humphries, *HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo*. Cell, 2002. **109**(1): p. 39-45.
123. Sauvageau, G., et al., *Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo*. Genes Dev, 1995. **9**(14): p. 1753-65.
124. Argiropoulos, B. and R.K. Humphries, *Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis*. Oncogene, 2007. **26**(47): p. 6766-76.
125. Klump, H., B. Schiedlmeier, and C. Baum, *Control of self-renewal and differentiation of hematopoietic stem cells: HOXB4 on the threshold*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1044**: p. 6-15.
126. Beslu, N., et al., *Molecular interactions involved in HOXB4-induced activation of HSC self-renewal*. Blood, 2004. **104**(8): p. 2307-14.
127. Krosl, J., et al., *In vitro expansion of hematopoietic stem cells by recombinant TAT-HOXB4 protein*. Nat Med, 2003. **9**(11): p. 1428-32.
128. Pickart, C.M., *Back to the future with ubiquitin*. Cell, 2004. **116**(2): p. 181-90.
129. De Sepulveda, P., S. Ilangumaran, and R. Rottapel, *Suppressor of cytokine signaling-1 inhibits VAV function through protein degradation*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14005-8.

130. Chauhan, A., et al., *The taming of the cell penetrating domain of the HIV Tat: myths and realities*. J Control Release, 2007. **117**(2): p. 148-62.
131. Futaki, S., S. Goto, and Y. Sugiura, *Membrane permeability commonly shared among arginine-rich peptides*. J Mol Recognit, 2003. **16**(5): p. 260-4.
132. Madlambayan, G.J., et al., *Clinically relevant expansion of hematopoietic stem cells with conserved function in a single-use, closed-system bioprocess*. Biol Blood Marrow Transplant, 2006. **12**(10): p. 1020-30.
133. Amsellem, S., et al., *Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein*. Nat Med, 2003. **9**(11): p. 1423-7.
134. Huang, C.H., et al., *Purified recombinant TAT-homeobox B4 expands CD34(+) umbilical cord blood and peripheral blood progenitor cells ex vivo*. Tissue Eng Part C Methods, 2010. **16**(3): p. 487-96.
135. Zhong, Y., B. Sullenbarger, and L.C. Lasky, *Effect of increased HoxB4 on human megakaryocytic development*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **398**(3): p. 377-82.
136. Zhang, X.B., et al., *Differential effects of HOXB4 on nonhuman primate short- and long-term repopulating cells*. PLoS Med, 2006. **3**(5): p. e173.
137. Schiedlmeier, B., et al., *High-level ectopic HOXB4 expression confers a profound in vivo competitive growth advantage on human cord blood CD34+ cells, but impairs lymphomyeloid differentiation*. Blood, 2003. **101**(5): p. 1759-68.